

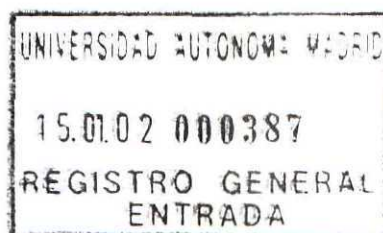
C/2378

Q
X

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Facultad de Ciencias
Departamento de Química Física Aplicada



**INFLUENCIA DE DISTINTAS VARIABLES TECNOLÓGICAS
EN LA COMPOSICIÓN VOLÁTIL Y FENÓLICA Y EN LAS
CARACTERÍSTICAS ESPUMANTES DE VINOS ESPUMOSOS**



M^a ANGELES DEL POZO BAYÓN
Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC)
Madrid, 2001



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Física Aplicada

**INFLUENCIA DE DISTINTAS VARIABLES TECNOLÓGICAS
EN LA COMPOSICIÓN VOLÁTIL Y FENÓLICA Y EN LAS
CARACTERÍSTICAS ESPUMANTES DE VINOS ESPUMOSOS**

Reg. F.C 30249

Memoria presentada por:

M^o Angeles del Pozo Bayón

para optar al grado de

Doctor en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Directores: M^a Carmen Polo Sánchez y Encarnación Pueyo Pérez

Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC)

	PRESENTACIÓN DEL TRABAJO	1
1	INTRODUCCIÓN	
1.1	Los vinos espumosos.	4
1.1.1	Tiraje.	5
1.1.2	Rima.	6
1.1.3	Punta.	6
1.1.4	Degüelle.	6
1.1.5	Adición del licor de expedición.	6
1.2	El aroma de los vinos.	8
1.2.1	Principales factores que influyen en el aroma de los vinos espumosos.	14
1.2.1.1	Influencia del tiempo de envejecimiento en botella.	14
1.2.1.2	Influencia de la técnica de elaboración del vino espumoso.	19
1.2.1.3	Influencia de la cepa de levadura empleada en la segunda fermentación.	20
1.2.1.4	Influencia de la utilización de clarificantes para facilitar el degüelle.	21
1.3	Relación entre la composición química del vino y la calidad sensorial.	23
1.3.1	Metodología analítica empleada para el análisis de compuestos responsables del aroma en los vinos.	25
1.3.1.1.	Extracción con disolventes.	26
1.3.1.2	Técnicas de espacio de cabeza.	28
1.3.1.3	Extracción por retención en polímeros porosos.	29
1.3.1.1	Microextracción en fase sólida (SPME).	30
1.3.1.5	Otros sistemas de extracción.	32
1.4	Los compuestos fenólicos del vino.	32
1.4.1	Clasificación de los compuestos fenólicos.	33
1.4.1.1	Compuestos fenólicos no flavonoideos.	34
1.4.1.2	Compuestos fenólicos flavonoideos.	37
1.4.1.3	Compuestos fenólicos minoritarios. Estilbenos.	46
1.4.1.4	Compuestos fenólicos producidos durante la fermentación alcohólica.	48
1.4.1.5	Compuestos fenólicos polimerizados.	48
1.4.2	Principales factores que afectan al contenido fenólico del vino.	49
1.4.2.1	Factores edafo-climáticos.	49
1.4.2.2	Tiempo de maceración.	50
1.4.2.3	Variedad de uva y añada.	51
1.4.2.4	Microorganismos.	52
1.4.2.5	Influencia de los distintos microorganismos en el contenido de polifenoles del vino.	52
1.4.2.6	Efecto del envejecimiento con levaduras en la composición polifenólica de los vinos.	55

1.4.3	Evolución de los compuestos fenólicos durante el envejecimiento de los vinos.	57
1.4.4	Importancia de los compuestos fenólicos en el vino.	59
1.4.4.1	Influencia en la calidad sensorial.	59
1.4.4.2	Acciones farmacológicas.	62
1.4.5	Metodología analítica empleada en el análisis de los compuestos fenólicos.	64
1.4.5.1	Preparación de la muestra.	64
1.4.5.2	Extracción.	64
1.4.5.3	Purificación y concentración.	65
1.4.5.4	Análisis.	65
1.4.5.5	Análisis global.	66
1.4.5.6	Análisis individualizado.	66
1.4.5.7	Cromatografía de líquidos de alta eficacia.	67
2	MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1	Descripción de los vinos estudiados.	71
2.1.1	Vinos espumosos elaborados a partir de mezclas de variedades blancas, con cinco cepas de levadura distintas y adición o no de bentonita en el licor de tiraje.	71
2.1.1.1	Elaboración de los vinos espumosos.	71
2.1.1.1.a	Cepas de levadura empleadas en la segunda fermentación.	71
2.1.1.1.b	Preparación del pie de cuba y realización del tiraje.	73
2.1.1.1.c	Toma de muestras.	73
2.1.2	Vinos espumosos elaborados con la variedad de uva blanca Parellada.	74
2.1.2.1	Elaboración de los vinos espumosos.	74
2.1.2.1.a	Preparación del pie de cuba y realización del tiraje.	74
2.1.2.1.b	Toma de muestras.	75
2.1.3	Vinos base y vinos espumosos elaborados con las variedades de uvas tintas Trepát, Monastrell y Garnacha.	75
2.1.3.1	Elaboración de los vinos espumosos.	75
2.1.3.1.a	Preparación del pie de cuba y realización del tiraje.	75
2.1.3.1.b	Toma de muestras.	77
2.1.4	Elaboración de vinos base y vinos espumosos por mezcla de variedades de uvas blancas y tintas.	77
2.1.4.1	Elaboración de los vinos espumosos.	77
2.1.4.2	Preparación del pie de cuba y realización del tiraje.	79
2.1.4.3	Toma de muestras.	79
2.2	Metodología empleada para la determinación de compuestos volátiles.	81
2.2.1	Análisis de los compuestos volátiles de los vinos por inyección directa (DI-GC-FID).	81
2.2.1.1	Análisis de los compuestos volátiles por DI-GC-FID, y empleo de una columna cromatográfica microrrellena.	81
2.2.1.1.a	Preparación de la muestra.	81
2.2.1.2.b	Equipo.	82
2.2.1.2.c	Condiciones cromatográficas.	83
2.2.1.2.d	Identificación y análisis cuantitativo.	83

2.2.1.2	Análisis de los compuestos volátiles por DI-GC-FID, y empleo de una columna cromatográfica capilar.	85
2.2.1.2.a	Preparación de la muestra.	85
2.2.1.2.b	Equipo.	85
2.2.1.2.c	Condiciones cromatográficas.	85
2.2.1.2.d	Identificación y análisis cuantitativo.	85
2.2.2	Análisis de los compuestos volátiles de los vinos por microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME-GC).	87
2.2.2.1	Análisis de los compuestos volátiles mediante el empleo de la microextracción en fase sólida del espacio de cabeza y detección por ionización de llama (HS-SPME-GC-FID).	88
2.2.2.1.a	Preparación de la muestra.	88
2.2.2.1.b	Equipo.	88
2.2.2.1.c	Condiciones cromatográficas.	90
2.2.2.1.d	Identificación y análisis cuantitativo.	90
2.2.2.2	Análisis de los compuestos volátiles mediante el empleo de microextracción en fase sólida del espacio de cabeza y detección por espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS).	92
2.2.2.2.a	Preparación de la muestra.	92
2.2.2.2.b	Equipo.	93
2.2.2.2.c	Condiciones cromatográficas.	93
2.2.2.2.d	Identificación.	93
2.3	Análisis de compuestos fenólicos de bajo peso molecular.	94
2.3.1	Análisis de compuestos fenólicos de bajo peso molecular mediante el empleo de RP-HPLC-DAD.	94
2.3.1.1	Preparación de la muestra.	94
2.3.1.2	Equipo.	94
2.3.1.3	Condiciones cromatográficas.	95
2.3.1.4	Detección.	95
2.3.1.5	Identificación y análisis cuantitativo.	95
2.3.2	Análisis de compuestos fenólicos de bajo peso molecular mediante el empleo de RP-HPLC-ESI-MS.	96
2.3.2.1	Preparación de la muestra.	96
2.3.2.2	Equipo.	96
2.3.2.3	Condiciones cromatográficas.	96
2.3.2.4	Detección.	97
2.4	Determinaciones convencionales.	97
2.4.1	pH.	97
2.4.2	Acidez volátil.	98
2.4.3	Acidez total.	98
2.4.4	SO ₂ total.	98
2.4.5	Polifenoles totales.	98
2.4.6	Ácido tartárico.	98
2.4.7	Ácido málico.	99
2.4.8	Ácido láctico.	99
2.4.9	Azúcares reductores.	99

2.4.10	Grado alcohólico.	99
2.4.11	Nitrógeno total.	99
2.4.12	Determinación de proteínas.	100
2.4.13	Determinación de aminoácidos libres.	100
2.5	Análisis de compuestos antociánicos.	100
2.5.1	Preparación de la muestra.	100
2.5.2	Equipo.	100
2.5.3	Condiciones cromatográficas.	101
2.5.4	Detección.	101
2.5.5	Identificación y análisis cuantitativo.	102
2.6	Determinación de los parámetros de color.	102
2.6.1	Equipo.	102
2.6.2	Intensidad de color.	102
2.6.3	Tonalidad.	102
2.6.4	Porcentajes de rojo, amarillo y azul.	102
2.7	Estudio de las propiedades espumantes de los vinos.	103
2.7.1	Determinación de las propiedades espumantes mediante el empleo de un equipo con detector de ultrasonidos y guía de ondas.	103
2.8	Análisis sensorial.	107
2.8.1	Análisis sensorial global de los cavas.	107
2.9	Métodos estadísticos.	109
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1	Identificación de los compuestos volátiles minoritarios por espectrometría de masas (MS).	111
3.2.	Validación del método de HS-SPME empleado para el análisis de compuestos volátiles minoritarios.	115
3.2.1	Repetibilidad.	117
3.2.2	Límite de detección.	118
3.2.3	Linealidad.	119
3.2.4	Recuperación.	120
3.3	Identificación de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular mediante el empleo de cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) con un detector de fotodiodos alineados y por acoplamiento con un detector de espectrometría de masas.	124
3.3.1	Compuestos de los que se ha dispuesto de patrones comerciales.	128

3.3.2	Compuestos identificados por los parámetros espectrales clásicos y otros parámetros descritos por Bartolomé y col. (1993).	130
3.3.3	Estilbenos.	130
3.3.4	Compuestos fenólicos no descritos previamente en vinos espumosos.	131
3.4	Composición global de los vinos estudiados.	139
3.4.1	Composición global del vino base y de los vinos espumosos elaborados con diferentes cepas de levadura y con adición o no de bentonita en la solución de tiraje.	139
3.4.2	Composición global de los vinos espumosos de la variedad Parellada procedentes de uvas de viñas sometidas a elevada explotación (vinos PA1 y PA2) y de uvas de viñas cultivadas según las prácticas tradicionales de la zona del cava.	141
3.4.3	Composición global de los vinos espumosos elaborados con uvas de las variedades tintas Trepát, Monastrell vinificadas en blanco y con uvas de la variedad Garnacha vinificadas en rosado.	143
3.4.4	Composición global del vino base y los vinos espumosos denominados Tipus y de los vinos de mezcla.	143
3.5	Composición nitrogenada de los vinos base y espumosos.	146
3.5.1.	Composición nitrogenada del vino base y de los vinos espumosos elaborados con diferentes cepas de levadura y con adición o no de bentonita en la solución de tiraje.	146
3.5.2	Composición nitrogenada de los vinos espumosos de la variedad Parellada procedentes de uvas de viñas sometidas a elevada explotación (vinos PA1 y PA2) y de uvas de viñas cultivadas según las prácticas tradicionales de la zona del cava (PB1 y PB2).	152
3.5.3	Composición nitrogenada de los vinos espumosos elaborados con uvas de las variedades tintas Trepát, Monastrell vinificadas en blanco y con uvas de la variedad Garnacha vinificadas en rosado.	156
3.5.4	Composición nitrogenada del vino base y los vinos espumosos denominados Tipus y de los vinos de mezcla.	159
3.6	Compuestos volátiles en vinos base y en vinos espumosos.	163
3.6.1	Concentración de los compuestos volátiles en los vinos base.	163
3.6.1.1	Ésteres.	176
3.6.1.2	Alcoholes.	177
3.6.1.3	Ácidos grasos.	178
3.6.1.4	Otros compuestos volátiles.	179
3.6.2	Concentración de los compuestos volátiles en los vinos espumosos.	179
3.6.2.1	Ésteres.	183
3.6.2.2	Alcoholes.	184
3.6.2.3	Ácidos grasos.	184
3.6.2.4	Otros compuestos.	185
3.6.3	Influencia de la cepa de levadura empleada en la segunda fermentación, y de la adición de bentonita en el licor de tiraje.	185
3.6.3.1	Influencia de la cepa de levadura empleada en la segunda fermentación, y	188

	de la adición de bentonita en el licor de tiraje.	
3.6.3.2	Influencia de las condiciones de cultivo.	189
3.6.3.3	Influencia de la segunda fermentación.	191
3.6.3.4	Influencia del tiempo de envejecimiento con las levaduras (90 a 270 días).	193
3.6.3.5	Resumen de los cambios producidos durante la segunda fermentación y el envejecimiento de los vinos en presencia de levaduras.	198
3.7	Compuestos fenólicos de bajo peso molecular en vinos base y vinos espumosos.	200
3.7.1	Concentración de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular en los vinos.	200
3.7.1.1	Ácidos hidroxibenzoicos.	207
3.7.1.2	Ácidos hidroxicinámicos.	207
3.7.1.3	Ésteres hidroxicinámicos.	208
3.7.1.4	Estilbenos.	208
3.7.1.5	Otros compuestos.	209
3.7.2	Influencia de diferentes factores en los compuestos fenólicos de bajo peso molecular de los vinos.	211
3.7.2.1	Influencia de las condiciones de cultivo en la composición de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular de los vinos espumosos elaborados con la variedad Parellada.	211
3.7.2.2	Influencia de la variedad de uva empleada en la composición fenólica de los vinos.	216
3.7.2.3	Influencia del tiempo de envejecimiento.	217
3.7.3	Análisis cluster.	218
3.8	Compuestos antociánicos en los vinos base y espumosos elaborados con diferentes variedades de uvas tintas.	220
3.8.1	Concentración de antocianos en los vinos base y espumosos elaborados con diferentes variedades de uvas tintas.	223
3.8.1.1	Glucósidos.	225
3.8.1.2	Glucósidos dehidroxilados.	225
3.8.1.3	Complejos antociano-procianidina.	225
3.8.1.4	Glucósidos acetilados.	226
3.8.1.5	Glucósidos cumarílicos.	226
3.8.1.6	Antocianos complejos.	226
3.9	Determinación de los parámetros de color en los vinos base y espumosos elaborados con variedades tintas.	235
3.9.1	Intensidad colorante.	235
3.9.2	Tonalidad.	236
3.9.3	Porcentaje de rojo.	237
3.9.4	Porcentaje de amarillo.	237
3.9.5	Porcentaje de azul.	237
3.10	Análisis de las características espumantes de vinos base y vinos espumosos	241

3.10.1	Análisis de las características espumantes de los vinos elaborados con diferentes cepas de levadura, y con adición o no de bentonita en el licor de tiraje.	241
3.10.2	Estudio de las características espumantes de los vinos elaborados con las variedades de uvas tintas Trepát, Monastrell y Garnacha. Cambios durante la segunda fermentación y el envejecimiento con las levaduras desde 9 a 18 meses.	245
3.10.3	Estudio de las características espumantes de los vinos espumosos elaborados con la variedad Parellada. Influencia de las condiciones de cultivo.	253
3.10.4	Análisis de las características espumantes de los vinos espumosos elaborados con mezclas de variedades blancas y tintas.	258
3.10.5	Estudio de correlación entre las distintas variables químicas analizadas en los vinos y los parámetros espumantes.	261
4	CONCLUSIONES	265
5	BIBLIOGRAFÍA	268

La Memoria que aquí se presenta se encuadra en el Proyecto de Investigación financiado por la CICYT, **ALI97-0396-C02-02** que lleva por título "**Nuevos aspectos vitivinícolas y tecnológicos a considerar en el estudio de la optimización de la espuma del cava**". Los objetivos de este Proyecto se plantearon en estrecha colaboración con los elaboradores del sector que nos transmitieron su inquietud por mejorar la calidad general de los vinos espumosos y más concretamente la de su espuma. Se consideró que era necesario profundizar en el conocimiento de las variables tecnológicas que pueden afectar a la calidad de los vinos. Algunas de las variables como el tiempo de envejecimiento, la variedad de uva, la cepa de levadura y la adición de bentonita en la solución de tiraje, ya habían sido estudiadas por nuestro grupo anteriormente, pero era necesario completar los estudios anteriores ampliándolos a nuevas muestras y a nuevas determinaciones. Había otras variables como las condiciones de cultivo de la vid y la utilización de uvas de variedades tintas solas o mezcladas con blancas, cuyo estudio se abordaba por vez primera.

Existe la preocupación de los elaboradores de la pérdida de la calidad de las uvas de la variedad Parellada, la más apreciada de las variedades blancas del cava, por estar siendo sometida a condiciones de cultivo que favorecen una mayor producción. También se sabe de forma empírica que los vinos espumosos que incluyen en su composición uvas de variedades tintas dan espuma de mejor calidad que aquellos en los que se han utilizado solo variedades blancas. Estos dos hechos había que confirmarlos y conocer sus causas. Por ello se ha planteado esta investigación que tiene como **objetivo** general la mejora de la calidad de los vinos espumosos y más concretamente la de su espuma, y como objetivos parciales, el estudio de:

- 1 *La influencia de la cepa de levadura y de la adición de bentonita en la solución de tiraje, en la composición de los vinos espumosos.*
- 2 *La incidencia de la sobreexplotación de las vides de la variedad Parellada en la calidad de los cavas.*
- 3 *La posibilidad de la utilización de uvas de variedades tintas como mejorantes de la calidad de los vinos espumosos.*

Debido a que existen numerosos estudios sobre la fracción nitrogenada de los vinos espumosos y de los cambios que se producen en esta fracción durante el envejecimiento con las levaduras, no se ha estimado necesario considerar este grupo de compuestos en esta Memoria. En cambio, la falta de estudios sobre la fracción volátil y polifenólica de estos vinos y especialmente de los cambios que se producen en el envejecimiento han hecho que profundicemos en estos aspectos de la composición de los vinos espumosos.

Para llevar a cabo estos objetivos se ha realizado el siguiente **Plan de Trabajo**:

- *Elaboración de los vinos*

Se han elaborado, a nivel industrial, con distintas cepas de levadura, vinos espumosos procedentes de un único vino base, y con adición o no de bentonita en la solución de tiraje, vinos espumosos de la variedad Parellada procedente de viñedos tradicionales y en sobreexplotación, vinos de variedades tintas vinificadas en blanco y de sus mezclas con un vino blanco, y un vino espumoso rosado.

- *Estudio de los vinos*

A los vinos elaborados, se les ha realizado el estudio de su composición global, de la fracción volátil, de los compuestos fenólicos y de las características de la espuma. Para realizar este estudio ha sido necesario poner a punto y validar un método de HS-SPME para el análisis de los compuestos volátiles minoritarios y utilizar la espectrometría UV-VIS y la espectrometría de masas acoplada a HPLC para la identificación de los compuestos fenólicos.

- *Relación entre las variables analíticas y los factores estudiados*

Para el estudio de las relaciones existentes entre las variables analíticas y los parámetros espumantes, se han aplicado diversas técnicas de análisis multivariante.

1-Introducción

1.1 Los vinos espumosos

Los vinos espumosos según el artículo 21 del Estatuto de la Viña, del Vino y de los Alcoholes, Ley 25/1970, son vinos procedentes de uvas de variedades adecuadas, que contienen como consecuencia de su especial elaboración gas carbónico de origen endógeno. Este gas carbónico habrá de proceder de una segunda fermentación de los azúcares agregados o naturales del vino base, realizada en envase cerrado. El producto terminado deberá tener una presión mínima de 4 atmósferas medidas a 20 °C.

Los vinos espumosos según su elaboración se clasifican en espumosos fermentados en botella y espumosos fermentados en grandes envases o granvás.

En los vinos fermentados en grandes envases, la segunda fermentación se realiza en depósitos de cierre hermético, y posteriormente se trasvasan a botellas para su comercialización. Se pueden denominar “granvas” o de “grandes envases” indistintamente.

En los vinos espumosos fermentados en botella, todo el proceso de elaboración y crianza hasta la salida al mercado, se realiza en la propia botella. Este proceso se efectuará en cavas o locales de condiciones térmicas adecuadas. A esta técnica de elaboración se la denomina método clásico, tradicional o “Champenoise”

La Orden de 14 Noviembre de 1991 (B.O.E, nº 278) establece la denominación “cava” para los vinos espumosos de calidad elaborados por el método tradicional o “champenoise” en un ámbito geográfico delimitado, y que procedan de variedades de uva autorizadas para la obtención de vinos base destinados a la elaboración de estos vinos. Estas variedades son en el caso de uva blanca, Macabeo, Xarel.lo, Parellada, Subirat o Malvasía Riojana, y Chardonnay, y como variedades tintas, Garnacha tinta y Monastrell. Sólo para la obtención de cavas rosados se autorizan otras dos variedades tintas: Pinot Noir y Trepat.

Las principales etapas en la elaboración de los vinos espumosos por el método tradicional son: tiraje, rima, punta, degüelle, y adición del licor de expedición. El esquema de elaboración se muestra en la figura 1.

1.1.1 Tiraje.

Es el llenado de la botella con el vino base y la adición de una solución que se denomina “licor de tiraje”.

El vino base suele ser una mezcla de vinos varietales en proporciones adecuadas para obtener una calidad determinada, se le denomina también vino de cupada. Debe presentar ciertas características organolépticas (color pálido, aroma afrutado, etc.) y analíticas (concentración de oxígeno suficiente para el desarrollo de las levaduras, poco contenido en azúcar residual, contenido en alcohol moderado, y una baja acidez volátil). No debe tener levaduras residuales, ni bacterias, y se habrá realizado la estabilización tartárica. Una vez introducido en la botella no se le podrá hacer ningún otro tratamiento.

El licor de tiraje es una solución formada por las levaduras, sacarosa, mosto de uva concentrado rectificado o no, o bien mosto de uva parcialmente fermentado, en proporción adecuada para que la fermentación produzca la presión de anhídrido carbónico deseada. Además se añade una pequeña cantidad de bentonita con el objetivo de facilitar la floculación y posterior eliminación de las levaduras. La cantidad de bentonita empleada es de aproximadamente 3 g/100 mL.

Las levaduras empleadas en la segunda fermentación además deberán reunir una serie de características como actividad fermentativa a baja temperatura, resistencia al etanol y a la presión de CO₂, capacidad de floculación, etc.

1.1.2 Rima

Las botellas se colocan en posición horizontal en locales de crianza especialmente habilitados para ello. Durante esta etapa se producirá la segunda fermentación, toma de espuma y crianza. La legislación española establece que el vino deberá permanecer en esta etapa como mínimo nueve meses.

1.1.3 Punta

En esta etapa las botellas se someten a un proceso de removido, para conseguir que todo el sedimento se dirija al cuello de la misma. Este proceso que se hacía tradicionalmente colocando las botellas sobre pupitres, girándolas manualmente un octavo de vuelta durante quince días hasta que quedaban prácticamente perpendiculares al suelo, ha sido sustituido en la actualidad, por sistemas mas o menos automatizados que permiten manipular el conjunto de botellas de una sola vez.

1.1.4 Degüelle

Consiste en la eliminación de las lías que se realiza provocando su depósito en el cuello de la botella poniéndolas boca abajo. Este depósito se congela al introducir la botella en un baño criogénico. A continuación se invierte y se le quita el tapón y por la propia presión interna, el depósito congelado se expulsa.

Si se emplean levaduras incluidas o inmovilizadas en bolitas de alginato cálcico o dentro de un cartucho que se coloca en el cuello de la botella, se evita la etapa de punta y se facilita el degüelle, pues no es necesario la congelación del cuello de la botella con las lías.

1.1.5 Adición del licor de expedición.

Durante la etapa de degüelle se pueden producir pérdidas de vino, esto se compensa con la adición del licor de expedición, que puede ser el propio vino espumoso o bien

sacarosa, mosto de uva, mosto de uva parcialmente fermentado, o mosto de uva concentrado rectificado o no, vino base o una mezcla de dichos productos, con adición en su caso de destilados de vino. De esta manera se consigue dar al cava el grado de dulzor deseado.

Por último se cierra la botella con el tapón definitivo, que se sujeta al cuello con el bozal o morrión.

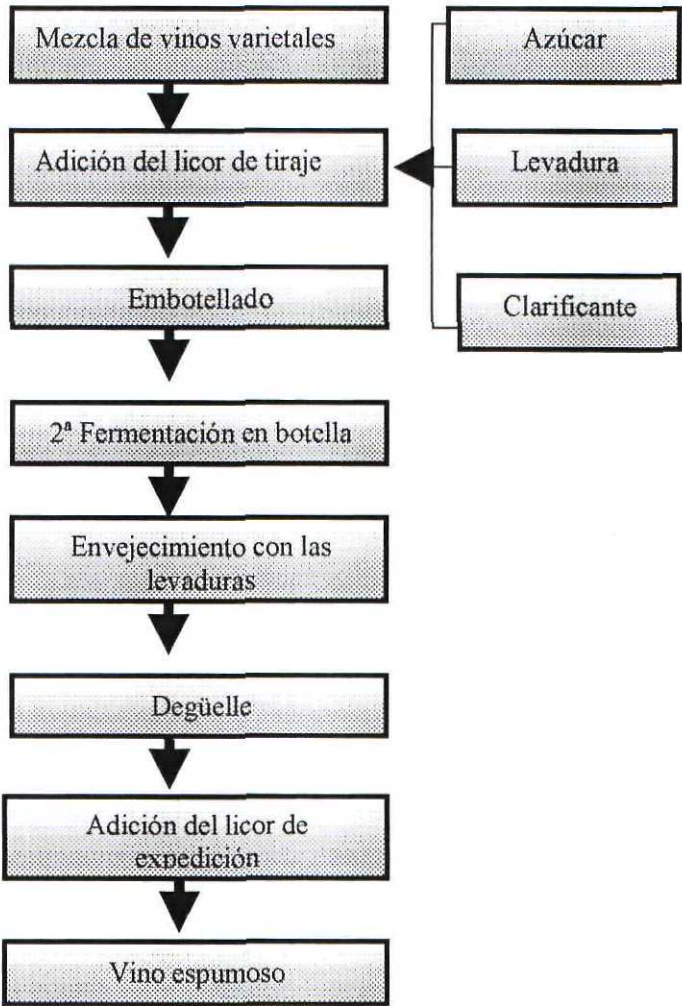


Figura 1. Esquema de elaboración de los vinos espumosos.

1.2 El aroma de los vinos.

El aroma de los vinos en general, es el resultado de una larga secuencia de transformaciones biológicas, bioquímicas y tecnológicas que transcurren desde el mosto en fermentación hasta el vino.

En el vino se conocen hoy en día cientos de sustancias integrantes de la fracción aromática (Morrot y Brochet, 1999). Estas sustancias son muy heterogéneas en cuanto a sus características físico-químicas, tales como puntos de ebullición, concentración en la que se encuentran en el medio, polaridad, etc.

Para que un compuesto químico determinado sea considerado como sustancia odorante debe ser capaz de liberarse de la matriz en la que se encuentra, e interaccionar con los sensores del olfato. Por tanto este tipo de sustancias son moléculas de bajo punto de ebullición, es decir, compuestos volátiles que están débilmente unidos a la matriz, en este caso al vino. Presentan pesos moleculares que oscilan entre 30 y 300 Da.

Dentro de los compuestos responsables del aroma de los vinos se encuentran grupos químicos bastante heterogéneos tales como alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos volátiles, terpenos, piracinas, etc. La concentración de estos compuestos oscila bastante, desde miligramos hasta picogramos por litro. Sus orígenes son diversos, pudiéndose distinguir tres tipos de aroma según procedan de la uva, se generen durante la etapa fermentativa o se originen durante la etapa de crianza.

El aroma primario, se debe a sustancias que se encuentran en la uva, que se han sintetizado en la propia planta. Este tipo de aroma se denomina también varietal, por ser específico de una variedad de uva determinada (Codornier y Bayonove, 1979, 1980, y 1982). A este grupo pertenecen alcoholes formados por cadenas hidrocarbonadas de entre cuatro y once átomos de carbono, aldehídos de seis átomos de carbono, y algunos ésteres y derivados terpénicos como nerol, linalol, geraniol, terpineol, citronelol, etc. Este último

grupo de compuestos se encuentran en muy pequeña concentración en los vinos, pero tienen una gran importancia por presentar umbrales de percepción muy bajos, asignándoles aromas delicados y de mucha fragancia, que son muy característicos en algunos vinos blancos, sobre todo en los procedentes de uvas moscatel. Además, los alcoholes terpénicos y sobre todo los óxidos terpénicos, presentan una propiedad muy interesante a la hora de la diferenciación varietal de mostos de uvas, y es que estos compuestos apenas se modifican durante la fermentación alcohólica permitiendo descubrir a través de ellos el carácter varietal del vino (Drawert y Schreier, 1978).

Los alcoholes y aldehídos de seis átomos de carbono son los principales responsables de los olores herbáceos, que presentan determinados vinos que proceden de vendimias poco maduras o de mostos obtenidos por fuertes presiones.

Al tener los hollejos una distribución aromática diferente a la de la pulpa, dependiendo del tiempo de contacto con ellos, varía el aroma del mosto (Herraiz y col., 1990). También las uvas que han sido infectadas por el hongo *Botrytis cinerea* presentan un perfil aromático alterado.

Algunos autores afirman la existencia de un aroma prefermentativo, que se forma como consecuencia de la actuación de las enzimas de la uva en los procesos de prensado y manipulación previa a la fermentación (Joslin y Ough, 1978; Cayrel y col., 1983). A este grupo pertenecen algunos compuestos presentes en el mosto como 1-hexanol, cis-3-hexen-1-ol, trans-2-hexen-1-ol, linalol, metanol, alcohol bencílico y ácidos grasos de cadena larga (Herraiz, 1989)

El **aroma secundario** o también llamado fermentativo, aparece durante la fermentación como consecuencia del metabolismo de las levaduras. En esta etapa el vino se enriquece en aromas respecto al mosto. La mayor parte de los componentes del aroma se forman como productos secundarios del metabolismo de la levadura durante la fermentación alcohólica. Los compuestos más importantes que se forman en esta etapa son alcoholes, ésteres, ácidos grasos, y aldehídos.

El alcohol mayoritario es el etanol, seguido por dioles, y alcoholes superiores (Pueyo, 1994). Dentro de este último grupo se incluyen los alcoholes isoamílicos, el isobutanol y el n-propanol. Los alcoholes superiores pueden originarse por diversos mecanismos: por la ruta de Ehrlich a partir de los aminoácidos precursores directos, fundamentalmente valina, leucina e isoleucina que originan isobutanol, alcohol isoamílico y alcohol amílico respectivamente, a partir de otro grupo de distintos aminoácidos no precursores directos, como subproductos de una biosíntesis cuyo fin es la producción de aminoácidos precursores, o bien a partir de azúcares y ácidos cetónicos. La composición del sustrato de partida es muy importante para la producción de alcoholes superiores.

Los aldehídos proceden de la degradación de los azúcares o se forman durante el envejecimiento, excepto el acetaldehído. Únicamente se pueden encontrar en las etapas iniciales tras la fermentación del mosto, ya que rápidamente se reducen a alcoholes. Las cetonas que se encuentran en el vino proceden de la uva.

Los fenoles volátiles del vino, no sólo proceden del metabolismo de las levaduras o de las bacterias, sino de la hidrólisis de compuestos fenólicos de elevado peso molecular presentes en las uvas.

Los ésteres son un grupo muy importante de compuestos que se originan durante esta etapa, ya que son los principales responsables de los aromas afrutados. Hay dos grupos fundamentales de ésteres, que son los acetatos de alcoholes superiores y los ésteres etílicos de ácidos grasos. El éster más abundante es el acetato de etilo. La concentración final de ésteres en el vino es dependiente de su formación y destrucción durante el proceso de fermentación y de su distribución entre el vino y la levadura.

Herraiz y Ough (1993), demostraron que los ésteres etílicos de aminoácidos se formaban durante la segunda etapa de la fermentación alcohólica y en el periodo en el que el vino permanecía en contacto con las levaduras. Al inicio de la fermentación, los aminoácidos que son tomados del medio por las levaduras o que son sintetizados, se

emplean en la síntesis de proteínas. Según los autores, el incremento de ésteres etílicos ocurre siempre que la concentración de aminoácidos permanece baja en el medio, lo que coincide con un aumento en la concentración intracelular de etanol debido a que se produce en etapas avanzadas de la fermentación. Este aumento de etanol podía esterificar los aminoácidos que previamente habían sido activados para la biosíntesis de proteínas.

Zea y col. (1994), en un estudio llevado a cabo en vinos de Jerez comprobaron que las levaduras de flor tienden a producir una gran cantidad de ácidos grasos, y ésteres etílicos durante la fermentación. Observaron que después de 134 días de contacto del vino con las levaduras de flor, se produce un descenso de los ácidos grasos hexanoico, octanoico y decanoico, y los ésteres etílicos de estos ácidos, hexanoato, octanoato, y decanoato de etilo. Esta disminución la explican por el crecimiento de las levaduras, o bien por fenómenos de hidrólisis tanto química, que se produce por el pH de estos vinos, como indican Romey y Ough (1980), o por hidrólisis enzimática, ya sea por enzimas de la uva, o de la levadura, no sólo debidas a la liberación de esterasas intracelulares como resultado de un proceso de lisis post-fermentación, sino también por la actividad hidrolítica de la propia levadura. Sin embargo, indican que esta última posibilidad parece inconsistente con el aumento intracelular de octanoato de etilo y decanoato de etilo que encontraron.

Los ácidos grasos volátiles, se producen principalmente durante la fermentación. Aunque en el vino están presentes en cantidades traza, sus bajos umbrales de percepción y sus olores picantes hacen que sean de especial importancia en el aroma final del vino. Los ácidos isopentanoico, hexanoico, y octanoico, han sido descritos como responsables del carácter rancio, dulce, sudor, fétido, y graso en los vinos. Sólo el octanoico proporciona una débil nota frutal. El decanoico y tridecanoico, han sido descritos como causantes de notas aromáticas desagradables de tipo graso y cítrico, (Miranda-López y col., 1992).

La biosíntesis, por tanto, de este tipo de compuestos responsables del aroma secundario, se podría iniciar cuando la levadura incorpora ácidos grasos de cadena larga que están presentes en el mosto, y secreta al medio ácidos grasos de cadena corta y media. Además consume aminoácidos y libera alcoholes superiores mediante mecanismos de

transaminación y descarboxilación dando lugar al aldehído que se reducirá al correspondiente alcohol. Otra vía de síntesis de este tipo de compuestos es a partir de carbohidratos, como ocurre principalmente en la formación del 1-propanol. Esto está regulado por la concentración de aminoácidos que haya en el medio. La síntesis de ésteres se produce a partir de los Acetil CoA y los alcoholes, mediante alcoholisis y liberación del Coenzima A, y por tanto su liberación al medio es paralela a la formación de ácidos grasos y alcoholes. La síntesis de ácidos grasos de cadena media se produce por liberación del Acetil CoA de la biosíntesis de ácidos grasos por la levadura y separación del Coenzima A. Esta es la forma en la que se secretan al medio elevadas cantidades de los ácidos hexanoico, octanoico, decanoico y dodecanoico. En la figura 2 se muestra de manera esquemática la síntesis de este tipo de compuestos por las levaduras.

El **aroma terciario o "bouquet"**, es el aroma adquirido a lo largo del envejecimiento como resultado de las transformaciones producidas en los compuestos originados durante la fermentación. Estas transformaciones pueden ser de tipo oxidativo en los vinos envejecidos en madera, lo que no es el caso de los vinos espumosos, pero también se producen fenómenos de reducción, durante la etapa de crianza en botella.

Los componentes del aroma de cualquier vino además de depender de la variedad de uva, dependen de factores ambientales (clima, suelo), de las condiciones de cultivo de la vid, de la madurez del fruto, de las condiciones de fermentación como pH, temperatura, nutrientes del mosto, microflora, concentración de SO₂ (Herraiz y col., 1989 y 1990) y finalmente de los tratamientos postfermentativos (clarificantes, mezclas, etc.)

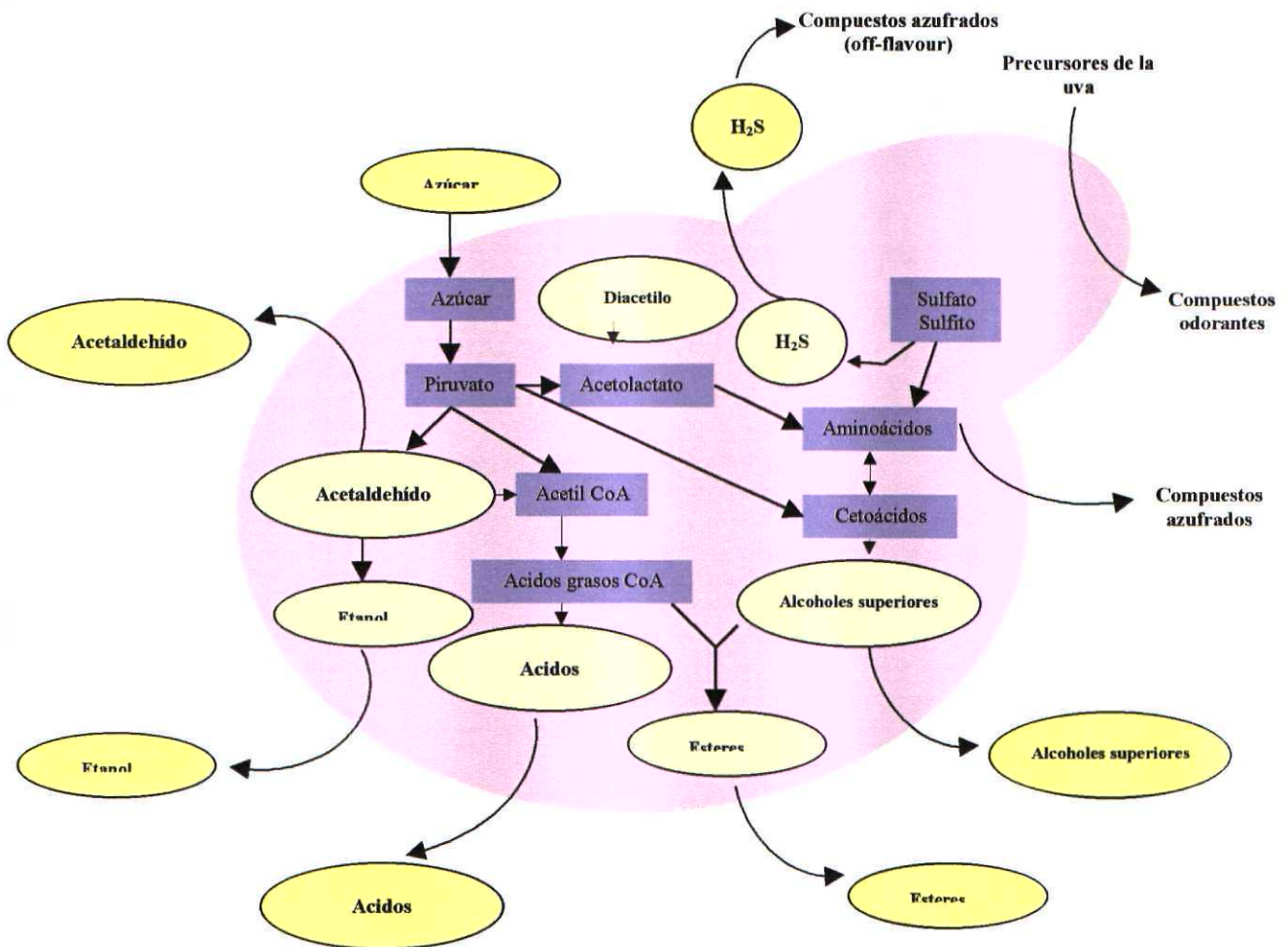


Figura 2. Representación esquemática de la formación de compuestos del aroma por las levaduras (adaptado de Lambrechts y Pretorius, 2000)

1.2.1 Principales factores que influyen en el aroma de los vinos espumosos

1.2.1.1 Influencia del tiempo de envejecimiento en botella

Los vinos espumosos, presentan unas características singulares de aroma y sabor, que contribuyen a la calidad y carácter propio del producto final debidas fundamentalmente al envejecimiento con las levaduras. Durante esta etapa, ha sido demostrada la existencia de un proceso de autólisis (Feuillat y Charpentier, 1982, Moreno-Arribas y col., 1998) en el cual, las levaduras experimentan una lisis celular sin rotura de pared cuando agotan los nutrientes del medio tras la segunda fermentación. Este proceso que ocurre durante la etapa de envejecimiento, puede implicar una liberación de ciertos componentes y enzimas proteolíticas desde el interior citoplasmático al seno del vino (Lurton, 1988; Leroy y col., 1990), con lo cual durante el tiempo que permanece el vino en contacto con las levaduras se podrían modificar las características aromáticas del vino espumoso.

Lubbers y col. (1994), en un estudio llevado a cabo sobre la influencia de las paredes de las levaduras sobre alguno de los compuestos volátiles del vino, como el alcohol isoamílico, octanol, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, y β -ionona, llegaron a la conclusión de que estos compuestos disminuían tras el contacto con las paredes de la célula. El compuesto mas retenido era la β -ionona, que es más hidrófoba. Por tanto sugerían que los mecanismos de eliminación de estos compuestos del vino se producen por uniones hidrofóbicas con los lípidos de la pared de la levadura. Sin embargo, cuando repitieron el experimento con paredes libres de lípidos encontraron que los compuestos volátiles también disminuían aunque mucho menos, por tanto no sólo la unión hidrofóbica era la explicación, sino también se producían fenómenos de adsorción que los hacía disminuir. Sugerían además la posibilidad de que otros compuestos como las proteínas también podrían unirse a este tipo de compuestos.

Algunos autores como Loyaux y col, (1981), han estudiado como influye la autólisis de las levaduras en el aroma de los vinos Champagne, y observaron un incremento de

compuestos volátiles mayoritarios sobre todo de ésteres durante el envejecimiento, después la mayoría permanecían constantes. Sin embargo, no encontraron evidencias de la influencia de la cepa de levadura en la evolución de volátiles durante este envejecimiento. Con el método de extracción que emplean no extraen compuestos de elevado punto de ebullición, que son los que se piensa realmente influyen en la calidad del vino.

Mólnar y col. (1981), encontraron que la concentración de componentes de relativamente alto punto de ebullición, especialmente algunos ésteres como hexanoato de etilo, miristato de etilo, palmitato de etilo, palmitoleato de etilo, estearato de etilo, oleato de etilo, linoleato de etilo, además de cis-farnesol y trans-farnesol, aumentaba considerablemente a lo largo del envejecimiento con las levaduras. También comprobaron que como consecuencia de la autólisis de las levaduras, la concentración de decanoato de etilo aumentaba en todos los vinos espumosos que estudiaron. Las diferencias fueron mas pronunciadas en los componentes de alto punto de ebullición que eran los que más variaban con el envejecimiento con las levaduras y que a su vez eran los que proporcionan las características aromáticas peculiares a este tipo de vinos. Comprobaron en el experimento que hicieron con levaduras autolisadas e intactas, que la concentración de volátiles aumentaba en todos los casos, aunque este aumento era mucho mas pronunciado cuando se utilizaban las autolisadas. Con las levaduras autolisadas se vio que aumentaban sobre todo los ácidos carboxílicos alifáticos y los ésteres etílicos de alto número de átomos de carbono. Además demostraron que la concentración de estos compuestos también estaba relacionada con la temperatura de almacenamiento.

Silva y col. (1987), también encontraron diferencias en la concentración de compuestos volátiles durante el envejecimiento con las levaduras. Así determinaron que a los siete meses, el succinato de dietilo aumentaba, mientras que el acetato de isoamilo disminuía, tanto en presencia como en ausencia de levaduras, aunque esta disminución era mayor en el caso de estar las levaduras presentes. En cambio los ácidos volátiles aumentaban con el contacto e indican que esto, podría ser una consecuencia de la persistencia de actividad esterásica intracelular, que en los experimentos que llevaron a cabo era posible detectarla hasta 300 días después del final de la segunda fermentación



Las conclusiones de trabajos anteriores en las que prácticamente todos los autores coinciden en que durante la etapa de envejecimiento se produce un aumento de algunos compuestos volátiles, sobre todo ésteres, contrasta con los resultados obtenidos por Cavazza y col. (1990), que comprobaron en un estudio llevado a cabo en tres vinos espumosos almacenados con las levaduras durante 21 meses, que los compuestos volátiles que proporcionaban aromas afrutados a los vinos espumosos, fundamentalmente ésteres acéticos de alcoholes superiores o ésteres etílicos de ácidos grasos, disminuían con el tiempo de almacenamiento. Compuestos como los alcoholes superiores, acetaldehído, γ -butirolactona, y n-hexil derivados como el trans-3-hexenol, también mostraban variaciones cuantitativas ligadas a la segunda fermentación, produciéndose ligeros aumentos durante el envejecimiento, pero no particularmente ligados a la cepa de levadura que se empleaba en la fermentación.

En cuanto a la influencia del tiempo de envejecimiento con las levaduras en vinos de cava, Gordillo (1990), comprobó que no existían diferencias cuantitativamente apreciables en los alcoholes superiores, pero si, en los alcoholes y aldehídos de seis átomos de carbono, y sus correspondientes ésteres, que disminuían con el tiempo de envejecimiento, lo cual beneficiaba a la armonía gustativa y aromática del vino, que se alcanzaba a partir de los 14 y 18 meses. Sin embargo, debido a procesos de esterificación e hidrólisis, los ésteres de ácidos grasos en especial el lactato de etilo y el succinato de dietilo presentan aumentos lentos y continuos durante el envejecimiento de los vinos de cava, lo cual tiene especial significación por su contribución a las cualidades organolépticas del vino.

También Pueyo (1994), hizo el seguimiento de la evolución de los compuestos volátiles a lo largo del envejecimiento con las levaduras de un lote de cavas, tomando muestras inmediatamente después del tiraje, y a los 3, 6, 11, 17, 21, y 24 meses, no observando variaciones importantes en la composición alcohólica a excepción del 3-metil-1-butanol, que aumentaba a los 24 meses de envejecimiento en botella. Comprobó que se producía un aumento de los ésteres desde el vino de cupada hasta los 24 meses de

envejecimiento siendo el láctato de etilo el éster más importante y que los ácidos grasos volátiles hexanoico y octanoico, no variaban durante el envejecimiento, no detectando en ningún caso el ácido isobutírico. En cuanto a otros compuestos volátiles de interés, vio que el acetaldehído aumentaba durante la segunda la fermentación y el envejecimiento. También detectó el dietilacetil y la γ -butirolactona, no observándose variaciones a lo largo del envejecimiento.

La gran variabilidad encontrada por los distintos autores en el comportamiento de los compuestos químicos responsables del aroma de los vinos espumosos durante la etapa de envejecimiento, también fué puesta de manifiesto por Colagrande y Ottina (1990), que encontraron una gran heterogeneidad en los perfiles aromáticos de vinos espumosos italianos. Esta variabilidad la explican por las diferencias de composición de los distintos vinos base, las condiciones de fermentación, y los cambios que se producen en la segunda fermentación. Además comentan el papel muy importante que tienen las distintas cepas de levaduras, que tendrán distintos comportamientos durante la autólisis, debido a las diferencias existentes en las actividades enzimáticas y por tanto su incidencia en la producción de sustancias organolépticamente activas durante la autólisis.

Mazzolenni y Colagrande (1993), de nuevo, en el análisis de los compuestos aromáticos de vinos espumosos italianos fermentados en botella, obtienen unos coeficientes de variación muy altos para los distintos volátiles que analizan y dan la misma explicación, que esto se debe a que las vías de formación de estos compuestos dependen de muchos factores (temperatura de fermentación, clarificación del mosto, cepa de levadura etc.) que no se comprenden totalmente.

Prácticamente la totalidad de trabajos que tratan de ver la variabilidad en los compuestos del aroma durante el envejecimiento se han llevado a cabo en vinos espumosos elaborados a partir de uvas blancas. Sin embargo existen muy pocos trabajos en vinos espumosos de variedades tintas. Un trabajo relativamente reciente es el desarrollado por Nicolossi (1995), que estudiaron la composición aromática en un vino espumoso obtenido por el método "Champenoise" a partir de uvas tintas de la variedad Nerello Mascalese, pero

vinificadas en blanco, con lo cual el aporte de antocianos era muy pequeño. Tomaron muestras del mosto, mosto antes de la clarificación, después de la clarificación, vino base, del espumoso antes del degüelle, y de un espumoso preparado para su comercialización. Comprobaron que el cuadro aromático variaba mucho según iba avanzando el proceso de fermentación y de toma de espuma. Prácticamente no había terpenos ya que partían de una uva muy poco aromática. Resaltan sobre todo un continuo aumento en algunos ésteres, pero sobre todo los ésteres del ácido acético, acetato de isoamilo y de hexilo, que son los que aportan características de frescura y perfume y además son una expresión de una activa fermentación, como ya expresaron otros autores (Bertuccioli y Montedoro, 1981). También aumentaban otros compuestos aromáticos como el succinato de dietilo y el malato de dietilo. Estos autores afirman que el aumento de ésteres etílicos está mas influido por la temperatura y el proceso de fermentación, que por el proceso de autólisis de las levaduras. En cuanto a los ácidos grasos, butírico, hexanoico, octanoico y decanoico presentan un continuo aumento, aunque ligero, posiblemente debido al proceso de envejecimiento con las levaduras. Sólo el ácido octanoico aumentaba considerablemente en la segunda fermentación. La γ -butirolactona presentaba una continua disminución a lo largo de la segunda fermentación (al contrario de lo que ocurre en un vino tranquilo).

A pesar de lo anteriormente expuesto, hay autores que no encuentran cambios durante esta etapa, y que por tanto no han detectado ninguna influencia del contacto del vino con las levaduras, ni tampoco de la posible influencia de la autólisis en la composición aromática de los vinos espumosos. Usseglio Tomasset y col. (1983), no encontraron cambios apreciables en la concentración de volátiles entre los tres y veintinueve meses de contacto del vino con las levaduras durante el envejecimiento, afirmando que la calidad de un vino espumoso se debe fundamentalmente a la calidad del vino base de partida, a las características de la cepa de levadura empleada en la segunda fermentación, y de las condiciones del envejecimiento bajo presión de CO₂. Coinciden con los trabajos anteriores en que los compuestos volátiles mayoritarios en estos vinos son sobre todo algunos ésteres como el succinato de dietilo, succinato ácido de etilo, y los ácidos hexanoico y octanoico.

1.2.1.2 Influencia de la técnica de elaboración del vino espumoso.

Principalmente pueden distinguirse tres técnicas de elaboración de vinos espumosos, los vinos espumosos obtenidos por el método "Champenoise", en los que todo el proceso de elaboración tiene lugar en la misma botella, los vinos espumosos fermentados en botellas que se transvasan bajo nitrógeno o gas carbónico y se filtran, o método "transfer", y los vinos espumosos elaborados en depósito cerrado, método de grandes envases o método "charmat".

La técnica de elaboración del vino espumoso puede tener consecuencias en la fracción aromática del producto acabado. En ese caso no sería lo mismo un vino elaborado por el método "champenoise" en el cual hay un contacto del vino con las levaduras durante un periodo de tiempo mas o menos largo, que un vino espumoso elaborado por el método de grandes envases, en el cual el contacto es menor. En este sentido hay algunos trabajos que entre otras cosas, han tratado de ver como influye el proceso de elaboración en la composición aromática del vino final. Así, Postel y Ziegler (1991), hicieron un estudio de dos vinos base de distinta calidad para ver como influía el tiempo de almacenamiento con las levaduras en la composición aromática del vino espumoso final, estudiando además como afectaba a la composición aromática tres tipos de tecnologías distintas de elaboración de espumosos: fermentación en botella, fermentación en grandes envases, y fermentación en botella con trasvase bajo nitrógeno y filtrado. Comprobaron que el contenido de volátiles totales aumentaba a lo largo de la segunda fermentación, y durante el almacenamiento con las levaduras hasta 15 y 18 meses. Después de este tiempo, había una disminución de manera constante. Los compuestos que más aumentaban eran los ésteres, sobre todo el lactato de etilo y en menor medida el succinato de dietilo, que siempre se mantenía en bajos niveles. Los demás ésteres se mantenían siempre en bajas concentraciones (alrededor de 1 mg/L). Los compuestos carbonílicos, terpenos, metanol, y alcoholes superiores no se veían apreciablemente influidos por el tiempo de contacto de los vinos con las levaduras. Estos autores no encontraron diferencias significativas en la composición de volátiles con el tipo

de tecnología empleada en la elaboración ni con la distinta composición y calidad del vino base.

Moretti y Garofolo (1991), estudiaron el efecto del tiempo de envejecimiento en la composición aromática de los vinos espumosos producidos en grandes envases, y vieron que estos no cambiaban de manera significativa. Sólo el acetato, succinato, y lactato de etilo, aumentaban sensiblemente. Además vieron como el acetato de etilo mostraba una cierta dependencia de la levadura utilizada, como ya otros autores habían comprobado (Giodici y col. 1990). También se vio que en la producción de volátiles influyen mucho las condiciones de luz y oscuridad durante el almacenamiento del vino. Había mas producción de compuestos volátiles del aroma en condiciones de oscuridad, pudiendo deberse a la hidrólisis de este tipo de compuestos organolépticamente importantes por la acción de la radiación luminosa.

1.2.1.3 Influencia de la cepa de levadura empleada en la segunda fermentación

La levadura más utilizada para la producción de vinos espumosos es *Saccharomyces cerevisiae*. Piracci y col. (1992), realizaron un trabajo en el que un vino base “Moscato bianco”, se fermentaba con dos especies distintas de levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* y *Sacharomyces bayanus* en tres estadíos físicos distintos, libres, inmovilizadas en esferas de alginato de sodio o confinadas en un pequeño tubo cerrado con una membrana de celulosa. Comprobaron que *S. bayanus* era la máxima productora de acetatos de alcoholes superiores y de ésteres de ácidos grasos, y que con levaduras incluidas en esferas de alginato se obtenían los mejores resultados.

Sin embargo, Cavazza y col (1990), en un estudio que hicieron con tres cepas de levadura distintas en la segunda fermentación no encontraron diferencias significativas en la composición de volátiles.

Tini y col. (1995), estudiaron la influencia de la autólisis de la levadura, así como el método de producción del vino espumoso (segunda fermentación en grandes

envases o en botella). Llegaron a la conclusión de que la capacidad autolítica de la levadura influía de modo muy positivo en la calidad del vino espumante obtenido tanto en grandes envases como en la fermentación en botella. Comprobaron que la concentración de algunos compuestos como el glicerol, ácido succínico, ácido acético y alcoholes superiores no dependía de la cepa de levadura utilizada.

1.2.1.4 Influencia de la utilización de clarificantes para facilitar el degüelle

Hay muy pocos trabajos en la bibliografía en los que se estudie el efecto que tienen los clarificantes añadidos durante el tiraje, en la fracción volátil de los vinos espumosos. Sin embargo, si se ha estudiado el efecto que sobre esta fracción tienen, diferentes sustancias empleadas para clarificar los vinos, entre las que se encuentran algunos compuestos que se añaden para favorecer el removido de las lías, como por ejemplo la bentonita.

La influencia de distintos clarificantes sobre la composición aromática de los vinos, ha sido estudiada por algunos autores como Guillou y col. (1998), que trataban de encontrar el clarificante mas adecuado de los habitualmente empleados, como era la gelatina, albúmina de sangre, caseína y albúmina de huevo con bentonita. Comprobaron que la gelatina y la albúmina de sangre afectaban fundamentalmente a las características fisico-químicas. La albúmina de huevo disminuía el contenido ésteres, alcoholes superiores, acetaldehído y metanol, y por tanto no era aconsejable su empleo como clarificante de vinos. Sin embargo el análisis sensorial de los mismos vinos con los diferentes clarificantes no demostró grandes diferencias entre el empleo de uno u otro.

Lubbers y col (1996), estudiaron en soluciones modelo el efecto de distintos tipos de bentonita, y encontraron importantes diferencias en cuanto a su capacidad de unión a algunos compuestos volátiles como la γ -decalactona y la β -ionona. Demostraron a su vez, que la adsorción de este tipo de compuestos no se ve afectada por la concentración de etanol en el medio, y sin embargo si lo está por la concentración de azúcares, de esta

forma, se producía un aumento de la adsorción de estos compuestos cuando se añadían al medio glucosa y fructosa en concentración de 100g/L.

Puig-Deu y col (1999), estudiaron como afectaba el tipo de clarificante añadido a los mostos monovarietales Macabeo y Parellada antes de la fermentación, en la calidad de los vinos base y vinos espumosos de Cava. Estudiaron dos tipos de clarificantes, bentonita, y una mezcla formada por caseinato potásico, bentonita y celulosa microcristalina. Comprobaron que había diferencias según el tipo de clarificante que se utilizara. El empleo de la mezcla de distintos tipos de clarificantes, provocaba una disminución en la concentración de azúcares residuales, y por tanto la fermentación era más completa. Debido a la mayor adsorción de diferentes proteínas, entre otras algunas enzimas oxidativas, y de polifenoles, los vinos elaborados con la mezcla de agentes clarificantes, presentaban menor tendencia a la oxidación. Además el tiempo de estabilidad de la espuma era mayor y tenían menor contenido de compuestos nitrogenados y de algunos compuestos volátiles. El análisis sensorial demostró a su vez, que los vinos producidos con los dos tipos de clarificantes, presentaban diferencias organolépticas.

En el caso de los vinos espumosos elaborados por el método “ champenoise”, como se ha indicado con anterioridad, una pequeña cantidad de clarificante es empleada como coadyuvante en el proceso de elaboración para facilitar la posterior eliminación de las lías. La influencia de estos clarificantes en la composición aromática de este tipo de vinos no ha sido objeto de muchos estudios, únicamente Gerbi y col. (1990) estudiaron su efecto, y comprobaron que el empleo de bentonita, alginatos, y fosfatos usados para facilitar el degüelle, no afectaban a la composición aromática del vino determinada por análisis cromatográfico, pero si se evidenciaban diferencias en el análisis sensorial, comprobándose que el empleo de alginatos tenía un efecto negativo respecto a la bentonita y los fosfatos, además el alginato no facilitaba el degüelle.

1.3 Relación entre la composición química del vino y la calidad sensorial

Uno de los temas de investigación actualmente más interesantes dentro del estudio de los aromas del vino, especialmente en vinos espumosos, es el encaminado a encontrar la relación entre un aroma determinado, y el compuesto o compuestos químicos que lo originan.

Iacono y col. (1990), comprobaron la relación existente entre los datos químicos del análisis por cromatografía de gases de los distintos compuestos responsables del aroma, y el análisis sensorial, para distintos vinos espumosos de la variedad Chardonnay que habían sido cultivados en 27 puntos geográficos distintos. El análisis sensorial que fue realizado por un comité de expertos. Se comprobó la relación entre algunos componentes del aroma y el carácter que producían en el vino. Así se encontró una correlación entre la nota sensorial de caramelo-goma de mascar con los acetato de isobutilo y de hexilo, y de modo particular con el acetato de isopentilo. La nota aromática de fruta tropical se relacionó positivamente con los ésteres de etilo C₆ y C₈, la nota floral con el acetato de isobutilo, y la nota herbácea con el 4-vinilfenol, el acetato de isoamilo, y el β -feniletanol.

Otros autores como Colagrande y Ottina (1990), indican que las características afrutadas de frescura de los vinos espumosos, se deben a la composición de ésteres: isobutirato de etilo, acetato de isoamilo, acetato de n-hexilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo o acetato de β -feniletanol. Estos resultados concuerdan con los de otros autores que también consideran a los ésteres etílicos y acéticos responsables del aroma afrutado (Cavazza y col., 1990). Además sugieren que como consecuencia del envejecimiento con las levaduras se produce en los vinos espumosos italianos obtenidos por el método clásico, un aroma definido como “aroma de levadura” o “costra de pan”, atribuido al 2-metil-ditiometilfurano.

Entre la multitud de compuestos volátiles que un sistema es capaz de separar, sólo unos pocos tienen importancia aromática en el producto final. Los estudios olfatométricos

se basan en el empleo de la nariz humana como detector cromatográfico, de tal forma que sólo se obtenga respuesta de los compuestos odorantes.

La manera más sencilla y ampliamente utilizada de establecer la importancia sensorial de un compuesto odorante es el empleo del concepto del valor de aroma. El valor de aroma de un odorante se define como el cociente de la concentración de dicho componente y su umbral de olfacción, y se expresa en unidades de aroma (Etievant, 1991). Si el valor de aroma es <1 , se considera que el odorante no participa en el olor del producto evaluado. Si es >1 , el odorante participa efectivamente en el aroma y tanto más cuanto mayor es el valor del aroma. Para su cálculo se requiere por tanto, el conocimiento del valor umbral y la concentración del compuesto en los vinos.

El análisis olfatométrico o “sniffing”, es una valiosa herramienta para este tipo de estudios. Consiste en oler el efluente a la salida de la columna del cromatógrafo de gases, (parte del efluente se desvía al detector de ionización a la llama, y la otra parte se dirige a la nariz de la persona). Habitualmente, se van haciendo diluciones progresivas del compuesto detectado, (método del *aroma extract dilution*), hasta llegar a la no percepción del mismo. De esta manera se hacen unos diagramas llamados aromagramas, donde se representan las diluciones frente a la intensidad de respuesta percibida. Esto es muy importante para determinar los umbrales de percepción de un compuesto determinado y conocer que compuestos son los más relevantes en el aroma final de un vino (compuestos impacto), además de proporcionar gran ayuda para el conocimiento de las características aromáticas de los vinos, ya que puede suceder que el cromatograma nos indique la existencia de un pico grande, por tener un alto factor de respuesta en el detector cromatográfico, pero que tenga una baja percepción para la nariz humana, y por tanto no sea demasiado importante en el aroma final.

Aznar y col., (2001) emplearon la técnica del “aroma extract dilution” (AEDA), para conocer los compuestos impacto más representativos de vinos tintos de Rioja envejecidos. La mayoría de los compuestos odorantes los cuantificaron empleando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Además recogieron distintas

fracciones del vino por HPLC, y posteriormente las analizaron por cromatografía de gases-olfatometría, y cromatografía de gases-espectrometría de masas. De esta forma identificaron 58 compuestos de un vino tinto envejecido, y cuantificaron 52. Compararon las tres técnicas y demostraron que eran complementarias.

1.3.1 Metodología analítica empleada para el análisis de compuestos responsables del aroma en los vinos.

Los compuestos químicos responsables del aroma de los vinos se pueden dividir según la concentración en la que se encuentren, en compuestos volátiles mayoritarios, que son aquellos que se encuentran en mayor concentración, y que por tanto se pueden analizar directamente sin necesidad de extracción previa, y compuestos volátiles minoritarios, que son aquellos que por encontrarse en muy baja concentración requieren una etapa previa de extracción y concentración de los mismos. La manera más común de clasificar a estos compuestos es sin embargo, según su punto de ebullición. Así se pueden dividir en compuestos de volatilidad alta, que presentan puntos de ebullición menores de 140 °C, y que generalmente se analizan directamente, y compuestos de volatilidad media, que presentan puntos de ebullición mayores a 140 °C, y que normalmente requieren técnicas de extracción y concentración por encontrarse en el vino en muy pequeña cantidad.

La cromatografía de gases es la técnica más adecuada para el estudio del aroma de los vinos.

Los actuales avances en cromatografía de gases aplicados al análisis de vinos en general, están enfocados a la utilización de la menor cantidad de muestra posible y la determinación del mayor número de componentes de una manera rápida, sencilla y reproducible (sistemas de inyección de grandes volúmenes de muestra y concentración simultánea, inyectoros "purge and trap", microextracción en fase sólida, etc.) y por otro lado, a la detección e identificación de componentes traza de interés, bien sea por su contribución positiva al aroma del vino, por su posible efecto negativo ("off flavors"), o por su interés sanitario.

Cuando se analizan muestras complejas o demasiado diluídas, la preparación de la muestra es un paso indispensable. En estos casos, para el análisis de los compuestos volátiles por cromatografía de gases, es preciso la separación previa de los componentes no volátiles, cuantitativamente mayoritarios, aprovechando las diferencias de polaridad o de puntos de ebullición.

Los componentes que forman la fracción volátil del vino presentan un amplio rango de polaridad, volatilidad, y concentración, no existiendo un método universal adecuado para todos ellos, por tanto habría que considerar qué compuestos son los que nos interesan, antes de seleccionar el método de extracción.

Las técnicas de extracción y concentración que con mayor frecuencia se están empleando son las que se detallan a continuación

1.3.1.1 Extracción con disolventes

La extracción y enriquecimiento en volátiles usando disolventes es el método más utilizado para obtener una eficiente concentración. Para la elección del disolvente habrá que tener en cuenta su selectividad, poder de extracción, punto de ebullición, inercia química y facilidad para su purificación. Si se pretende extraer un gran número de compuestos químicos, el disolvente no debe ser muy selectivo.

Muchos son los trabajos que utilizan los disolventes como método de extracción de los volátiles minoritarios en vinos espumosos, (Garofolo y col, 1990; Mazzoleni y Colagrande, 1993 ; Nicolosi y col, 1995 etc.). Los disolventes que más se emplean para la extracción son: isopentano (Mólnar y col, 1979) y mezclas de n-pentano y cloruro de metileno (Cavazza y col, 1990; Moretti y Garofolo, 1991; Silva y col, 1987; Usseglio-Tomasset y col, 1983; Gerbi y col., 1990; Garofolo y col, 1994, etc). Otro tipo de disolvente que también ha sido utilizado es el Freón-11 (Herraiz, 1989; Pueyo, 1994; etc). Su uso ha estado muy extendido por su baja volatilidad (p.e = 32 °C) lo que hace que se

eluya muy pronto y que se elimine bien, su bajo poder extractor del etanol y otros alcoholes de cadena corta, poca selectividad, con lo que extrae un amplio rango de compuestos químicos de naturaleza diversa, no es necesario el secado de los extractos debido a que es poco miscible en agua, escasa reactividad, etc. Sin embargo, su uso se está abandonando debido a que es muy contaminante, agravado por el hecho de tener una alta estabilidad en la atmósfera.

Otras variantes a este sistema son la destilación por arrastre de vapor, la destilación a presión reducida, y la SDE (Simultaneous Distillation-solvent Extraction), que se han aplicado al análisis del aroma de vinos tranquilos, pero que no se ha aplicado al estudio de vinos espumosos.

En SDE, se emplea un disolvente de bajo punto de ebullición que extrae continuamente de la fase acuosa los compuestos volátiles evitando así su calentamiento. Los tiempos de extracción son de aproximadamente una hora. Con esta técnica se recuperan fundamentalmente compuestos de baja o media volatilidad, perdiéndose los compuestos altamente volátiles. La principal ventaja estriba en que utiliza poca cantidad de disolvente lo que hace innecesaria la etapa de concentración de la muestra. Algunos autores han aplicado vacío para aumentar la eficacia de la extracción (Blanch y col., 1996).

La microextracción con disolventes orgánicos es un método alternativo en el que se utilizan pequeños volúmenes de muestra (10-50 mL) y de disolventes (100 μ L-1 mL), que se someten a agitación durante aproximadamente 1 hora. Una vez recogida la fase orgánica, puede inyectarse directamente en el cromatógrafo en modo splitless. Con esta técnica se han obtenido buenos resultados cuantitativos para un gran número de componentes volátiles del vino (Ferreira y col., 1993, Ortega y col., 2001).

La utilización de disolventes para extraer los compuestos volátiles, presenta algunas desventajas, como la necesidad de concentrar el extracto obtenido para proceder a la inyección, con lo cual se pueden perder parte de los compuestos extraídos, el enmascaramiento de compuestos de bajo punto de ebullición con el pico del disolvente, el

uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos con el posible efecto negativo para el medio ambiente, etc. Todo esto implica la necesidad de avanzar en el desarrollo y mejora de los métodos de preparación de muestra.

1.3.1.2 Técnicas de espacio de cabeza.

Los sistemas de análisis de los componentes volátiles por técnicas de espacio de cabeza (Head-space), o también conocidas como técnicas de muestreo de la fase de vapor en contacto con la muestra, están teniendo actualmente un creciente interés, entre otras razones porque dan una idea bastante acertada de la composición de la fracción aromática, y bastante parecida a la que entra en contacto con las fosas nasales. Es una técnica muy adecuada para el análisis de los componentes más volátiles. El problema que plantean es que al estar los componentes más significativos desde el punto de vista sensorial en el rango de trazas, requieren métodos de concentración. Básicamente consisten en la preconcentración, para posterior análisis y determinación de la fase de vapor que se desprende de la matriz sólida o líquida. Se dividen en dos grandes grupos de técnicas: técnicas de espacio de cabeza estático o de equilibrio, y técnicas de espacio de cabeza dinámico.

El análisis del espacio de cabeza estático no es frecuente en los vinos, ya que el cromatograma que se obtiene es muy pobre. Para mejorar este tipo de análisis se recurre a los métodos de análisis del espacio de cabeza dinámico. Para ello se hace pasar el espacio de cabeza de una muestra de vino a través de un polímero adsorbente, el más empleado es el Tenax, posteriormente se desorben térmicamente los compuestos volátiles atrapados en el polímero. De esta forma Noble y col. (1980), consiguieron identificar 60 compuestos distintos y cuantificar 20 de ellos en vinos tranquilos, con buenos resultados de reproducibilidad.

Basados prácticamente en el mismo proceso están los sistemas de purga y trampa, en el que los analitos son arrastrados con un gas inerte (He o N₂), normalmente hasta una trampa rellena con un adsorbente. Generalmente para el análisis del vino se utiliza Tenax,

ya que presenta algunas ventajas como la baja retención para el etanol y el agua, y la posibilidad de realizar una desorción térmica a alta temperatura (300 °C) sin peligros de descomposición del polímero. Tras la desorción térmica la muestra suele pasar a una trampa criogénica en la que se concentran los analitos y se produce la focalización de los mismos antes de ser desorbidos nuevamente por calentamiento, para introducirlos en la columna cromatográfica. Los sistemas que incorporan trampas frías requieren la eliminación previa del agua contenida en la muestra, porque puede quedar retenida en la trampa. La desorción y el crioenfriamiento puede realizarse en sistemas comerciales que inyectan la muestra directamente en la columna. Para el análisis de compuestos volátiles del vino se ha utilizado el ATD (Automatic Thermal Desorption), en el que el arrastre con N₂ se realiza fuera del cromatógrafo (Salinas y col., 1994), el sistema TCTI (Thermal Desorption Cold Trap Injector), y el PTI (Purge Trap Injector), que permiten colocar la muestra dentro del inyector y hacer el arrastre, la desorción y el enfriamiento “on line” en el cromatógrafo (García-Jares y col., 1995).

En estos sistemas hay que tener en cuenta la temperatura y el tiempo de desorción, que deben ser lo suficientemente altos para como para desorber rápidamente todos los compuestos atrapados sin ocasionar reacciones de pirólisis, y es necesario hacer ensayos en blanco antes y después del análisis de los vinos para comprobar que el adsorbente no cede compuestos y que la desorción ha sido eficaz.

Trabajos recientes (Goodner y Rouseff, 2001) han demostrado la utilidad del empleo del espectrómetro de masas de trampa iónica como sensor químico (o “nariz electrónica”), para identificar y cuantificar componentes individuales en una muestra, y así poder clasificar diferentes zumos de uva que difieren únicamente en la concentración de un único componente añadido a distintas concentraciones.

1.3.1.3 Extracción por retención en polímeros porosos

La extracción de compuestos volátiles por adsorción en polímeros porosos ha sido empleada bastante en el análisis de vinos (Gunata y col., 1990; Di Stefano, 1991; Gómez y

col, 1995; etc) debido a que presenta algunas ventajas como son el requerir menos tiempo que la extracción líquido-líquido, necesitar menor cantidad de disolvente, y menor volumen de muestra.

El adsorbente debe presentar suficiente afinidad por los analitos a extraer y permitir posteriormente la elución fraccionada con un disolvente de adecuada polaridad. Los adsorbentes mas empleados son Amberlita XAD-2, Extrelut y Chromosorb, para análisis de alcoholes y ésteres en los vinos, realizando la elución con diclorometano o éter dietílico (Pérez-Coello, y Gonzalez-Viñas, 1995). El principal inconveniente es que los rendimientos obtenidos en la extracción son bajos para componentes polares (Gerbi y col., 1992), y por otro lado, es necesario concentrar el extracto y eliminar el disolvente antes de la inyección cromatográfica.

1.3.1.1 Microextracción en fase sólida (SPME).

La microextracción en fase sólida (SPME), es una nueva técnica de concentración desarrollada hace pocos años (Pawliszyn y col. 1990), para la concentración de las muestras previa a su análisis. Fue aplicada en un principio para el análisis de contaminantes en agua, pero se extendió su uso al análisis de compuestos responsables del aroma en alimentos (Yang y Peppard., 1994; Stephen y col., 1996). En vinos ha demostrado ser una técnica muy adecuada para la extracción de terpenos y de otros compuestos del aroma (De la Calle-García y col., 1996; Vas y col., 1998b; Hayasaka y Bartowsky, 1999). Comparada con las técnicas tradicionales ofrece enormes ventajas: alta sensibilidad y reproducibilidad, bajo coste, extracción sin disolventes, no requiere una preparación previa de la muestra, empleo de pequeños volúmenes de muestra, y posibilidad de automatización.

La técnica se basa, en la adsorción de los distintos analitos presentes en la muestra, en una fibra de sílice fundida recubierta con un polímero de distinta naturaleza dependiendo de la polaridad del analito a extraer (poliacrilato, polidimetilsiloxano, carboxen-divinilbenzeno, etc). De la Calle-García y col. (1997), demostraron que la extracción de alcoholes era mayor con fibras de poliacrilato (PA), que los terpenos se extraían bien tanto

con fibras de PA como con fibras de polidimetilsiloxano (PDMS), que las mejores extracciones para ésteres se realizaban con fibras de PDMS, y que para los ácidos se obtenían buenos resultados tanto con fibras de PA como con las de Carbowax/divinilbenceno (CW/DVB). La extracción se completa cuando se alcanza el equilibrio entre los analitos disueltos en la fase que recubre la fibra de sílice fundida, y los presentes en la muestra.

En SPME, se puede trabajar de dos formas distintas, sumergiendo la fibra directamente en la solución con los analitos (SPME-DI), o bien introduciéndola en el espacio de cabeza que queda entre la muestra y la tapa del vial (SPME-HS). Algunos autores han comparado los dos métodos de extracción. Así Vas y col., (1998a), encontraron que el análisis por inmersión con una fibra de PDMS extraía menos que el análisis del espacio de cabeza para la mayoría de los componentes del aroma de los vinos que analizaron. Sin embargo, compuestos polares con baja volatilidad, como la glicerina, se extraían mejor usando la inmersión. Otra desventaja que encontraron cuando empleaban fibras de PA en inmersión, es que la fibra se dañaba aproximadamente a los 20 análisis, mientras que el análisis del espacio de cabeza permite cientos de ellos. Indican que esto es debido fundamentalmente a la fuerte unión que se produce entre los polifenoles del vino y la fibra. De la Calle-García y col. (1998a), al comparar las dos técnicas, comprobaron que la capacidad de extracción era la misma, pero coinciden igualmente en que la duración de la fibra por inmersión es menor, e indican que con el análisis del espacio de cabeza se podría analizar el aroma de mostos con grandes cantidades de azúcar sin dañar la fibra.

Cuando la extracción ha sido completada se procede a la desorción térmica de los compuestos adsorbidos a la fibra en el inyector del cromatógrafo de gases, para su posterior separación cromatográfica.

En la técnica de SPME, es muy importante controlar y optimizar todas las variables que influyen en el proceso de extracción y desorción. La temperatura de extracción, la velocidad de agitación, volumen del vial de muestra, la adición de sales para mejorar la extracción, el tiempo y temperatura de desorción, son variables muy importantes a

controlar, y que han sido y son, objeto de estudio por numerosos autores que emplean esta técnica para el análisis de compuestos responsables del aroma en vinos (De la Calle-García y col., 1996 y 1998b; Hayasaka y col., 1999; Whiton y Zoecklein, 2000).

El calentamiento de la muestra, hace que se rompan las barreras que unen el analito a la matriz, permite el proceso de transferencia de masa aumentando la presión de vapor del analito, y por tanto facilitando su al espacio de cabeza.

1.3.1.5 Otros sistemas de extracción

Otro sistema de extracción de compuestos volátiles que está empezando a aplicarse en los vinos, es la extracción con fluidos supercríticos (SFE), que aunque da buenos resultados en soluciones modelo, no está aún muy adaptado para vinos (Blanch y col., 1995), y la extracción por microondas que ha sido ensayada por Razungles y col. (1994), y ha dado buenos resultados para algunos compuestos como lactonas, alcoholes y ácidos de cadena larga.

1.4 Los compuestos fenólicos del vino.

Dentro de la denominación general de “compuestos fenólicos” se incluye un gran número de compuestos muy heterogéneos que se caracterizan porque presentan un anillo aromático con al menos, una sustitución hidroxilo y una cadena lateral funcional.

Estos compuestos están ampliamente distribuidos por todo el reino vegetal. Proceden del metabolismo secundario de los vegetales, y tienen a los ácidos acético y siquímico como principales precursores (Ribéreau-Gayon, 1968).

En la uva se encuentran en las partes sólidas, preferentemente en hollejos, pepitas, y raspones, encontrándose diferencias cualitativas y cuantitativas según la parte de la baya de la que se trate, de la variedad, del estado de madurez y del año de producción.

1.4.1 Clasificación de los compuestos fenólicos

La clasificación de los compuestos fenólicos propuesta por Harbone y Simmonds (1964), según su esqueleto carbonado agrupa a estos compuestos en familias, siendo las más importantes, las que a continuación se detallan. Además se han incluido algunos compuestos fenólicos que se originan durante la fermentación alcohólica, y que habitualmente aparecen en los vinos.

□ Compuestos fenólicos no flavonoideos

C6	Fenoles sencillos
C6-C1	Alcoholes, aldehídos, cetonas y ácidos benzoicos.
C6-C2	Acetofenonas Alcoholes y ácidos fenólicos Ácidos mandélicos
C6-C3	Alcoholes, aldehídos y ácidos cinámicos Alcoholes y ácidos 3-fenil-1-propanoicos Cumárinas Isocumarinas Cromonas

□ Compuestos fenólicos flavonoideos

	Flavanonoles (dihidro-2,3-flavonoles)
	Flavonas
	Flavonoles
	Flavanonas (dihidro-2,3-flavonas)
C6-C3-C6	Isoflavanonas
	Flavanoles

Antocianos (antocianinas)

Auronas

Calconas

Dihidrocalconas

□ **Compuestos fenólicos polimerizados**

(C6-C1)_n Taninos hidrolizables

(C6-C3-C6)_n Taninos condensados

(C6-C3)_n Ligninas

□ **Compuestos fenólicos minoritarios**

C6, C10, C14 Quinonas

C6-C1-C6 Benzofenonas, xantonas

C6-C2-C6 Estilbenos

C18 Betacianinas

C30 Biflavonoides

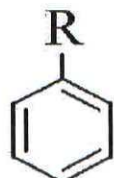
□ **Compuestos fenólicos producidos durante la fermentación alcohólica**

Tirosol

Triptofano

1.4.1.1 Compuestos fenólicos no flavonoideos

Se caracterizan por presentar un anillo bencénico que dependiendo de los sustituyentes va a dar lugar a distintas estructuras, como se recogen en la **figura 3**



R	Compuesto
-OH	Fenol
-CH ₂ OH	Alcohol bencílico
-COOH	Acido benzoico
-CHO	Aldehído benzoico
-COCH ₃	Cetona benzoica
-CH=CH-CH ₂ OH	Alcohol cinámico
-CH=CH-COOH	Acido cinámico
-CH=CH-CHO	Aldehído cinámico
-CH=CH-COO-	Cumarina
-CH ₂ -CH ₂ OH	Alcohol 2-feniletílico
-CH ₂ -COOH	Acido feniletílico
-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ OH	Alcohol 3-fenil-1-propílico
-CH ₂ -CH ₂ -COOH	Acido 3-fenilpropanoico
-CHOH-COOH	Acido mandélico

Figura 3. Estructura química de los compuestos fenólicos no flavonoideos

Este tipo de compuestos se encuentran en la naturaleza en forma libre o combinada. En el caso de los ácidos benzoicos sus combinaciones son poco frecuentes, los ácidos cinámicos, al contrario se suelen encontrar combinados con otras moléculas como hidroxiácidos, azúcares y otros compuestos fenólicos (Winter y Herrmann, 1986). Las combinaciones con hidroxiácidos se realizan a través de enlaces tipo éster entre el grupo carboxilo del ácido cinámico y un grupo alcohólico del hidroxiácido, que normalmente va a

ser el ácido quínico o el tartárico, predominando este último en la uva (Correa-Gorospe y col., 1991).

Los ácidos cinámicos por presentar un doble enlace con diferentes sustituyentes en un mismo carbono, pueden presentar las dos formas *cis* y *trans*, esta última es mas estable, y además las dos formas presentan propiedades biológicas diferentes. Cada isómero se puede transformar en el otro fácilmente bajo la influencia de la luz ultravioleta. La forma *cis* puede dar por ciclación las cumarinas (Butler y Siegelman, 1959).

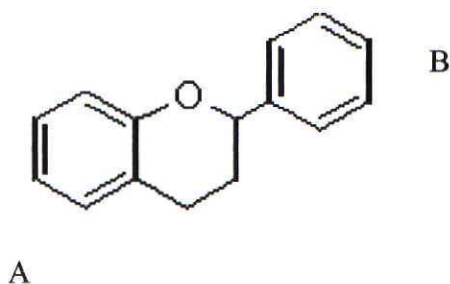
Estrella y col., (1984), encontraron en hollejos ácidos benzoicos: gálico, protocatéquico, gentísico, *p*-hidroxibenzoico, vainillínico, y siríngico; ácidos cinámicos: cafeico, *trans*-*p*-cumárico, *trans*-ferúlico y *cis*-ferúlico; Los aldehídos: vainillico, siríngico, *p*-hidroxibenzoico, 3,4-dihidroxibenzoico; y la cumarina escopoletina, observando diferencias cuali y cuantitativas entre variedades blancas y tintas. Boursiquot y col, (1986) encontraron también diferencias en la concentración de distintos ácidos hidroxicinámicos dependiendo de la parte de la baya (hollejo o pulpa) en la que se encuentren. Detectaron una mayor concentración de ésteres en los hollejos de uvas tintas que en los de las variedades blancas.

El ácido caferoil tartárico es el hidroxicinamato que se encuentra en mayor concentración en mostos y vinos, representa mas del 50% del total. Los ésteres tartáricos de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico también están presentes, pero en una menor proporción. Las formas *trans*, son los isómeros mayoritarios, pero las formas *cis* de estos ésteres también han sido detectadas (Baranowsky y Nagel, 1981; Romeyer y col., 1983).

Los ésteres de los ácidos ferúlico, cafeico, y *p*-hidroxicinámico con el ácido tartárico tienen una gran importancia en la identificación de variedades (Singleton y col., 1976; Singleton 1987; Macheix y Fleuriet, 1986; Lamuela y col., 1996). Estos ésteres participan en reacciones de pardeamiento de uvas y vinos, especialmente los del ácido cafeico (Romeyer y col, 1983).

1.4.1.2 Compuestos fenólicos flavonoideos

Constituyen el grupo más extenso de compuestos fenólicos en los vegetales. Están formados por dos ciclos bencénicos unidos por una cadena de tres átomos de carbono. Normalmente, estos tres átomos de carbono dan lugar a un heterociclo oxigenado. La estructura básica se recoge en la figura 4.



Se diferencian entre sí por el grado de oxidación y de sustitución del heterociclo (Figura 5). Dentro de cada familia flavonoidea, los distintos compuestos se diferencian por el número y localización de los grupos hidroxilo y/o metoxilo en los anillos A y B.

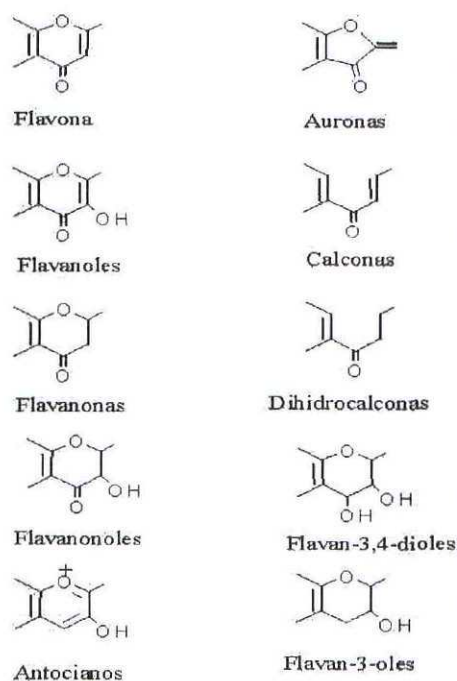


Figura 5. Estructura de la cadena lateral de los principales grupos flavonoideos

En la naturaleza se encuentran unidos a azúcares por uniones principalmente O-heterosídicas, y menos frecuentemente C-heterosídicas. Los glúcidos a su vez, pueden estar o no esterificados, principalmente con ácidos hidroxicinámicos.

Se podrían resumir todos los compuestos flavonoideos en la siguiente lista:

Flavononoles (dihidro-2,3-flavonoles)

Flavonas

Flavonoles (3-hidroxiflavonas)

Flavononas (dihidro-2,3-flavonas)

Isoflavanonas

Flavanoles:

- Flavan-3-oles
- Flavan-3,4-oles
- Flavan-4-oles

Antocianos (antocianidinas)

Auronas

Calconas

Dihidrocalconas

Los grupo de flavonoides mas representativos en las uvas y vinos, son los que a continuación se detallan.

□ **Flavononoles y Flavonas**

Se han encontrado flavononoles en hollejos y en raspones de uvas blancas, principalmente la astilbina (3-ramnósido de hidroquercetol), y la engelatina (3-ramnósido de dihidrokaempferol). En la hoja de *Vitis vinifera*, se ha demostrado la presencia de flavonas como el 7-glucósido de apigenol y luteolina (tomado de Flanzy, 2000).

□ **Flavonoles (3-hidroxi flavonas)**

Presentan un grupo carbonilo en el heterociclo en posición 4, y un grupo hidroxilo en posición 3. En las uvas estos compuestos están generalmente como glucósidos, el más abundante es el glucósido de quercetina, aunque también se han identificado, miricetina, quercetina, kaempferol, e isoramnetina, tanto en uvas blancas como en tintas (Fernández de Simón y col., 1992 a y b)

Durante el proceso de vinificación se produce la hidrólisis de los glicósidos, por lo que en el vino existe una gran parte en forma de aglicona (García-Viguera y Bradle, 1995). Sin embargo, la rutina (3-O-ramnoglicósido de quercetina), y la quercetina-3-glucurónido, este último confirmado por HPLC-MS, también ha sido encontrada en vinos (Lamuela-Raventós y Waterhouse, 1994, Betés-Saura y col., 1996). La quercetina 3-glucurónido, es el único flavonol que Ibern-Gómez y col., (2000), encontraron en vinos de cava, aunque en muy baja concentración (0,08-0,09 mg/L).

Cuantitativamente no existen diferencias en el contenido de estos compuestos entre uvas tintas y blancas, pero debido a que se localizan en hollejos y pepitas si hay variaciones en los vinos dependiendo del proceso de vinificación

□ **Flavanoles**

En este grupo se incluyen las catequinas (flavan-3-oles), que constituyen la base de los taninos condensados, las leucoantocianidinas (flavan-3,4-dioles), y los flavan-4-oles. Tienen el heterociclo totalmente saturado y un grupo hidroxilo en posición 3, lo que da lugar a dos carbonos asimétricos (C_2 y C_3) y determina la existencia de cuatro isómeros ópticos. Según el grado de hidroxilación del anillo B, y la orientación respecto al OH del heterociclo, da lugar a distintos compuestos que se denominan, catequina, epicatequina, galocatequina, y epigalocatequina.

Los flavonoles se localizan en las partes sólidas de la uva, tanto en variedades tintas como blancas, fundamentalmente en pepitas (Fernández de Simón y col., 1987). Son compuestos muy sensibles a la oxidación enzimática, por tirosinasa y lacasa (Oszmianski, 1986).

Su contenido en el vino depende de la variedad de uva, grado de madurez, tiempo de maceración, (Bourzeix y col., 1986; Lee y Jaworski, 1990, Mayen y col., 1995, etc). Algunos autores han observado una relación entre climas cálidos y secos, y contenido de estos compuestos en el vino, sin embargo trabajos recientes (Goldberg y col., 1999), no han llegado a la misma conclusión después del análisis de vinos procedentes de uvas cultivadas en ambientes climáticos muy diferentes.

□ Antocianos

Los antocianos (o antocianinas) representan una parte importante tanto a nivel cualitativo como cuantitativo de los flavonoides de la uva tinta. Son los principales responsables de la coloración roja de estas uvas. Se localizan en el hollejo y en las 3 o 4 primeras capas celulares del hipodermo. En las cepas tintoreras también pueden encontrarse en la pulpa. A nivel subcelular se ha demostrado su presencia en la vacuola, en unos orgánulos especializados denominados antocianoplastos (tomado de Flanzy, 2000).

Son derivados del 2-benzopirilio o ión flavilio (o flavilium), radical de carácter catiónico.

Los antocianos están presentes en la naturaleza como glicósidos y entonces reciben el nombre común de antocianos o antocianinas, a la aglucona correspondiente se la denomina antocianidina, o antocianidol.

Las antocianidinas del género *Vitis* son la cianidina, peonidina, petunidina, delfinidina, y malvidina (**Figura 6**).

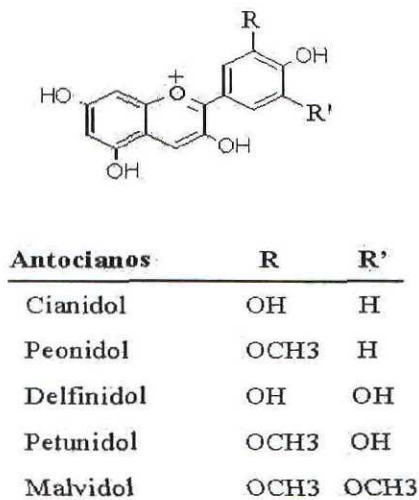


Figura 6. Estructura química de los compuestos antociánicos

El azúcar que forma parte de la molécula de antociano es generalmente la glucosa, aunque pueden encontrarse también galactosa, ramnosa y arabinosa. En las variedades de *Vitis vinifera*, estos pigmentos están presentes en forma de 3-glucósidos. En los diglicósidos el segundo azúcar aparece principalmente en posición 5.

Los antocianos se diferencian por sus niveles de hidroxilación y de metoxilación, por la naturaleza, y número de los ácidos que esterifican los azúcares, existiendo por tanto una gran diversidad de estructuras.

La acilación se realiza por esterificación del ácido sobre un hidroxilo del azúcar. Los ácidos que esterifican los azúcares, suelen ser ácidos hidroxicinámicos (p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico), y más raramente, p-hidroxibenzoico, acético, malónico, y succínico. La acilación aporta propiedades nuevas a la molécula de antociano como una mayor estabilidad durante el procesado y almacenamiento, así como respuesta distinta a los cambios del pH ya que previenen la formación de calconas incoloras (Brouillard, 1981, Francis, 1989).

El color de los antocianos en disolución depende del pH del medio. A pH menor de 2 la forma flavilium de color rojo es la que domina, mientras que a pH neutro o ligeramente básico, cambian a azul o violeta. También las interacciones entre ellos, y con otras moléculas del medio (copigmentación), así como la formación de complejos con iones metálicos se traduce en modificaciones del color.

Otras propiedades que presentan estas moléculas son la capacidad de unirse al SO₂ para formar aductos incoloros, variación de los máximos de absorbancia en el visible o en el ultravioleta dependiendo de los sustituyentes que presenten, capacidad para oxidarse o reducirse (se traduce en una rápida decoloración de la solución), y la baja estabilidad o facilidad de degradación frente a numerosos factores externos como son la presencia de azúcares, adición de enzimas o en condiciones de luz y calor.

Aunque el contenido de antocianos, como el del resto de los polifenoles, está muy influido por el suelo, la climatología, la madurez, y en el caso del vino, por las prácticas enológicas, ha sido estudiado con el objeto de diferenciar variedades de uva, incluso diferentes clones dentro de una misma variedad, (Roggero y col., 1984). También se ha empleado la determinación de los antocianos individualizados para identificar vinos obtenidos de diferentes variedades, (González-San José y col., 1990; Hebrero y col., 1988, etc), diferentes métodos de elaboración y zonas de producción (Awn y col., 1996; Santos y col., 1991 entre otros).

Durante la maduración y el envejecimiento, ocurre una importante modificación del contenido antociánico de los vinos. Se produce una progresiva desaparición de las antocianinas acompañada por la aparición de nuevos pigmentos, y por polímeros más estables (Somers, 1971; Somers y Vèrette, 1988). A la vez se produce una modificación del color de los vinos, que pasan progresivamente del rojo violáceo a un tinte teja. Todo esto va acompañado de una pérdida de astringencia.

Todas estas transformaciones, son debidas fundamentalmente a fenómenos de adición, que van a transformar estos compuestos fenólicos (también están implicados los flavanoles) de la uva en otras especies moleculares.

Muchos investigadores han estudiado la ausencia de correlación entre la intensidad de color y la concentración de antocianos libres (Glories, 1978; Somers, 1971; Timberlake y Bridle, 1976). Al pH del vino sólo el 15% de las formas libres son coloreadas. La degradación de estas formas inestables durante la maduración y el envejecimiento, y la persistencia del color en vinos envejecidos, sugiere que deben formarse otras moléculas más estables. Se conoce desde hace tiempo (Somers, 1971) que las formas libres que constituyen la totalidad de los pigmentos de la uva, van a ir reemplazándose por formas coloreadas poliméricas, que contribuyen en un 50% al color de vinos envejecidos después de un año, y al 85 % después de 10 años. Por lo tanto el color del vino va a ser debido además de a la presencia de antocianos libres, a las combinaciones “polifenol-antocianos”, y sobre todo a la asociación entre diferentes taninos y antocianos del vino. (tomado de Flanz y col., 2000)

En estos últimos años algunos trabajos han estado encaminados al conocimiento de estos mecanismos de formación, y a la elucidación de la estructura de estos nuevos compuestos formados por diferentes combinaciones entre taninos y antocianos (Escribano-Bailón y col, 1996, Fulcrand y col, b y c).

En las reacciones de adición, los antocianos y los taninos actuarían a la vez como nucleófilo y electrófilo. Se han demostrado distintos mecanismos de adición, como son la

adición de tipo antociano-tanino (Baranowski y Nagel, 1983; Timberlake y Bridle, 1976, Liao y col., 1992) en la que el antociano bajo su forma flavilium reacciona sobre una zona negativa de un flavonol, o bien el tipo de adición tanino-antociano, en el que el electrófilo es un carbocatión liberado por la ruptura de las uniones interflavánicas de los taninos que reaccionan con el antociano (Haslam, 1980).

Otras reacciones de adición más rápidas que también conducen a la formación de este tipo de moléculas son aquellas en las que intervienen productos de la fermentación alcohólica, como el etanal, que se forma por oxidación del etanol, o por descarboxilación del ácido pirúvico, (Timberlake y Bridle, 1976, Baranowski y Nagel, 1983; Bakker y col., 1993). Se han postulado distintos mecanismos para este tipo de reacciones que van a dar lugar a diferentes productos (Dournel, 1985 y Timberlake y Bridle, 1976). Actualmente por técnicas de espectrometría de masas y resonancia magnético nuclear (RMN), (Archier, 1992; Escribano-Bailón y col., 1996) se ha podido elucidar la estructura de compuestos formados por la unión de una catequina a un antociano, a través de un puente de etilo fijado en posición 8 sobre el antociano. Actualmente se desconoce en qué posición del flavonol se une el etanal.

Todas estas condensaciones sucesivas conducen a la formación de numerosos oligómeros y polímeros que están unidos por puentes de etilo. Se han detectado moléculas con dos unidades de catequina, y una de antociano, o dos unidades de catequina y dos antocianos, incluso tres unidades de catequina y una de antociano, (Fulcrand y col, 1996 c)

Cuanto mayor es el grado de polimerización del flavonol, mayor es la velocidad de estas reacciones tanto en ausencia como en presencia de etanal (Dallas, y col., 1996), de tal forma que los productos de adición coloreados en los vinos deben presentar pesos moleculares elevados.

Otros nuevos pigmentos pueden formarse como consecuencia de la reacción de antocianos con el vinilfenol, (Fulcrand y col., 1996 a). Los pigmentos formados son anaranjados y muy estables a la decoloración por SO₂. Además de estos, y con las mismas

características se han encontrado otros pigmentos poco polimerizados entre antocianos y diversos productos del metabolismo de las levaduras (Fulcrand y col., 1996 d).

Otra de las reacciones que va a influir en el color de los vinos, y en la que también van a intervenir los compuestos antociánicos, son las reacciones de copigmentación con otros compuestos fenólicos. Esto se traduce en un efecto batocromo, es decir, en un desplazamiento hacia longitudes de onda más elevadas, y un aumento en la intensidad de color. Parece que estas asociaciones están presentes sólo en vinos jóvenes. La (-)-epicatequina es el mejor copigmento flavonoide del vino en lo que respecta a la intensidad de color, pero los flavonoles y los ácidos fenólicos tienen una constante de asociación más fuerte con los cationes flavilium (Brouillard y col., 1991).

1.4.1.3 Compuestos fenólicos minoritarios. Estilbenos

Dentro de los compuestos fenólicos minoritarios, los estilbenos, constituyen uno de los grupos mas importantes tanto en las uvas como en los vinos. Actualmente su estudio es de creciente interés, debido a las innumerables propiedades terapéuticas que se les atribuyen, y que se deben principalmente a la capacidad que presentan de actuar como antioxidantes.

Son un grupo de compuestos $C_6-C_2-C_6$. En el vino los mas importantes, son el resveratrol en sus dos formas isoméricas, trans y cis, y sus respectivos glicósidos.

La mayor parte de resveratrol en la uvas se encuentra en el hollejo, en forma de glucósido de trans-resveratrol. Las prácticas enológicas como una maceración prolongada facilita la extracción de estos hacia el vino. Durante la vinificación se producen hidrólisis e isomerizaciones, (Roggero y García-Parrilla, 1995), por tanto en el vino se van a poder encontrar las dos formas isoméricas y las agluconas respectivas. Estos mismos autores han comprobado que las uvas sobremaduras contienen una gran cantidad de trans-resveratrol pero no del isómero cis.

El resveratrol actúa como una fitoalexina en *Vitis vinífera* por lo que su síntesis va a verse favorecida por el ataque del hongo *Botrytis cinerea*, o *Plasmodiopsis viticola*, a la baya. Por tanto, se ha encontrado mayoritariamente en vinos procedentes de uvas u hojas infectadas (Langcake y Pryce, 1976 y 1977; Derks y Creasy, 1989; Jeandet y col, 1992, y 1993). Sin embargo, otros estudios han encontrado resveratrol en hollejos sanos (Lamuela-Raventós y col., 1995; Roggero y García-Parrilla, 1995).

Se ha comprobado la existencia de una relación entre el contenido de resveratrol y el clima. Así Jeandet y col., (1995), encuentran un mayor contenido de resveratrol en uvas de climas fríos y lluviosos y lo atribuyen a una mayor incidencia de infecciones fúngicas, por lo que se sintetizaría más este compuesto. En climas templados se ha encontrado mayor concentración de la forma glucosilada, debido a que estas uvas presentarían mayor concentración de azúcares, y la glicosilación de los estilbenos estaría más favorecida (Goldberg y col, 1996 b). Sin embargo en un trabajo reciente, Goldberg y col., (1999), analizando 644 vinos comerciales de variedades blancas procedentes de distintas zonas geográficas del planeta, y por tanto con climas muy distintos, no han encontrado diferencias debidas a este factor.

Trabajos recientes han demostrado la existencia en el vino de numerosos compuestos pertenecientes a este grupo. Lamikanra y col., (1996), identificaron tentativamente mono-, di-, y tetrahidroxiestilbenos en vinos tintos usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Ribeiro de Lima y col, (1999) identificaron el 3,5,3',4'-tetrahidroxiestilbeno-3-O- β -glucósido(trans-astringina). Recientemente Baderschneider y Winterhalter (2000), han aislado e identificado siete nuevos derivados de estilbenos en un vino comercial de la variedad Riesling. Los nuevos compuestos identificados son el monoestilbeno 2,4,6-trihidroxifenantreno-2-O-glucósido, y dos isómeros de resveratrol-2-C-glucósido, además de cuatro dimeros de estilbeno, el cis- y trans- ϵ -viniferín diglucósido, el palidol glucósido, y el palidol diglucósido. Comprobaron que todos estos compuestos presentaban igual o mayor potencia antioxidante que los derivados de estilbenos conocidos hasta el momento.

1.4.1.4 Compuestos fenólicos producidos durante la fermentación alcohólica.

El tirosol y el triptofol son productos secundarios de la fermentación alcohólica originados a partir de los aminoácidos tirosina y triptófano. Moutounet (1969) indica que la formación de tirosol tiene lugar por acción de las levaduras, a partir de la glucosa, siguiendo la vía del ácido siquímico. Su formación depende de la cepa de levadura que interviene en la fermentación, y de la variedad de uva. Las variedades tintas parecen presentar mayor contenido de estos compuestos (Gómez-Cordovés y col, 1984). Se ha comprobado que cuando el vino envejece, el contenido de tirosol permanece constante, pero el triptofol va desapareciendo gradualmente con el envejecimiento (Yoneyama y Kushida, 1980).

Ibern-Gómez y col., (2000), encuentran que el tirosol, es el segundo compuestos fenólico cuantitativamente más importante en los vinos de cava que analizan. No determinan sin embargo triptofol.

1.4.1.5 Compuestos fenólicos polimerizados

En este grupo se incluyen los taninos y ligninas. Bate-Smith y Swain (1962), definen a los taninos como compuestos fenólicos solubles en agua, con pesos moleculares entre 500 y 3000 D, que además de dar las reacciones normales de los polifenoles, tienen propiedades especiales como la capacidad de precipitar distintos coloides, gelatinas y otras proteínas.

Los términos taninos condensados e hidrolizables, se han utilizado tradicionalmente para distinguir las dos clases de taninos mayoritarios de los vegetales.

Los taninos hidrolizables son complejos polifenólicos que pueden degradarse bajo distintas condiciones de hidrólisis en fragmentos más simples, normalmente azúcares y ácidos fenólicos.

Los taninos condensados o proantocianidinas, son polímeros de flavan-3-ol. La unión entre unidades de flavano se realiza mediante enlaces carbono-carbono, C₄-C₈ o C₄-C₆, y más raramente mediante enlace éter C₂-O-C₇. Este tipo de unión es muy estable, y por tanto estos compuestos no se fragmentan fácilmente.

1.4.2 Principales factores que afectan al contenido fenólico del vino

Las uvas contienen esencialmente compuestos no flavonoideos en la pulpa y flavonoideos en los hollejos, semillas y raspones. La tecnología que se aplique para la obtención del vino, condiciona por tanto la extracción de polifenoles de las diferentes partes del racimo, y las reacciones posteriores de estas moléculas, contribuyendo así de manera esencial a la composición polifenólica de los vinos.

1.4.2.1 Factores edafo-climáticos.

El clima, y el suelo, son dos de las principales variables que van a contribuir a la composición polifenólica de la baya de uva, y por tanto del vino.

Algunos autores han atribuido una clara influencia a los factores climáticos en el contenido de compuestos fenólicos del vino (Jeandet y col., 1995; Goldberg y col.1995), sin embargo estudios mas recientes restan protagonismo a este factor, en favor de otros como el tiempo de maceración (Goldberg y col., 1999).

Quintana-Gana y Gómez-Piñol (1989), comprobaron la importancia del contenido de sodio y del pH del suelo en la concentración de compuestos fenólicos en uvas de la variedad Xarel.lo, e indican que estos disminuyen durante la maduración de la baya. Comprueban a su vez, que la evolución de los polifenoles en estas uvas, es bastante similar a las de otras variedades típicas del Penedés, como Macabeo y Parellada.

1.4.2.2 Tiempo de maceración

Debido al diferente reparto y distinta solubilidad de los polifenoles en el racimo de uva, la maceración, proceso indispensable para la extracción de color durante la elaboración de los vinos tintos, y más concretamente las etapas de vinificación que van a favorecer la disolución de los flavonoides, determinan la composición fenólica de los vinos. Así los ácidos hidroxicinámicos que son los principales constituyentes fenólicos de la pulpa, son también los compuestos mayoritarios de los vinos blancos, mientras que los vinos resultantes de una maceración presentan una gran cantidad de flavonoides, provenientes de las partes sólidas del racimo.

Singleton y Trousdale, (1983), indican que el tiempo de maceración es uno de los factores que más afectan a la composición fenólica de los vinos. Otros factores que también van a influir son la variedad, la añada, el proceso de elaboración. Las diferencias debidas a la variedad parecen ser grandes y generalmente enmascaran a las debidas a la añada. A su vez, las diferencias debidas a la variedad y a la añada tienden a desaparecer o disminuir si se tiene en cuenta el factor del tiempo de maceración, que va producir un aumento en los vinos, de los componentes que son mayoritarios en los hollejos. Los compuestos que más pueden aumentar debido al tiempo de contacto, son algunos fenoles flavonoideos, el ácido gálico, que aumenta como consecuencia de la hidrólisis del epicatequíngalato, y los ácidos cafeico y cumárico por hidrólisis de los ésteres tartáricos respectivos durante esta etapa.

Estos mismos autores, han comprobado que el tiempo de maceración además de producir un aumento en algunos componentes específicos localizados en los hollejos y pepitas, va a provocar un aumento de otros compuestos como el tirosol, que se produce durante la fermentación de la levadura procedente del metabolismo de la tirosina, y puede aumentar con el tiempo de maceración ya que durante esta etapa se produciría una mayor extracción de aminoácidos.

Según algunos autores (Gunata y col., 1986; Cheyner y col., 1996), tras una maceración de 4 horas, la concentración de los ácidos hidroxycinámicos aumenta un 20%, y la de 3-flavonoles monómeros, y dímeros de procianidina, se multiplica por tres. Si la maceración es mas larga (20 h), no se traduce en una mayor extracción, pero una maceración carbónica de igual duración dobla la extracción de los ácidos hidroxycinámicos y aumenta diez veces la de los dímeros de proantocianidinas (Ricardo da Silva y col., 1993).

Goldberg y col., (1999), indican que la maceración es la variable que más influye en el contenido de trihidroxiestilbenos y 3-flavonoles, en los vinos blancos que analizan. No influye sin embargo, en el contenido de ácido p-cumárico.

1.4.2.3 Variedad de uva y añada

La variedad de uva juega un importante papel en el contenido final de compuestos fenólicos en el vino. Muchos autores han encontrado diferencias cuali y cuantitativas en variedades de uvas tintas y blancas (Estrella y col., 1984, Bourssiquot y col., 1986). También entre distintos clones de una misma variedad se han encontrado estas diferencias (Pigella y col., 1998).

Principalmente se han encontrado diferencias a nivel cuantitativo en la composición de ésteres hidroxycinámicos (Romeyer y col., 1983) en las distintas variedades blancas y en la proporción de ésteres o-difenoles (caftárico), en relación con otros ésteres hidroxycinámicos (cutárico y fertárico). Debido a esto, la capacidad del mosto a la oxidación difiere mucho, ya que el caftárico es el principal sustrato sobre el que actúa la polifenoloxidasas de la uva.

Los ésteres de los ácidos ferúlico, cafeico y p-cumárico aportan una gran información para la identificación de variedades (Singleton y col., 1976; Singleton 1987; Macheix y Fleuriet, 1986; Lamuela-Raventós y col., 1996).

1.4.2.4 Microorganismos

El efecto que los distintos microorganismos implicados en la fermentación, ya sean levaduras o bacterias lácticas, desempeñan en la composición polifenólica de los vinos no es todavía suficientemente conocido. Existen en la bibliografía pocos trabajos sobre el papel que desempeñan los microorganismos en los distintos procesos tecnológicos que se emplean en la industria enológica para elaborar los diferentes tipos de vinos que existen en el mercado.

El estudio de la influencia de los microorganismos en la composición fenólica de los vinos, podría ser abordado desde distintos puntos de vista, como son la capacidad que ciertos microorganismos tienen de producir diferentes compuestos, que pueden ser otros compuestos fenólicos, o bien de otra naturaleza, pero formados a partir de estos. Otro aspecto a considerar, es la capacidad que ciertos compuestos fenólicos pueden ejercer sobre el crecimiento de los microorganismos vínicos, y también el efecto que produce el envejecimiento de los vinos en contacto con las levaduras en este tipo de compuestos.

1.4.2.4. a Influencia de los distintos microorganismos en el contenido de polifenoles del vino

Las levaduras son incapaces de utilizar los ácidos hidroxicinámicos como única fuente de carbono, únicamente se produce la metabolización incompleta de este tipo de compuestos. Sin embargo, algunos autores (Duncan y col., 1995) han demostrado que algunas especies de levadura como *Brettanomyces anomalus* es capaz de metabolizar algunos ácidos cinámicos, para dar compuestos responsables de “off-flavors” en el vino. Además son capaces de transformar la vainillina en etanol y ácido vainillínico. La formación de estos dos últimos compuestos también se ha descrito en *Saccharomyces cerevisiae* (De Wulf y col., 1986).

Los ésteres de los ácidos ferúlico y cumárico son particularmente importantes porque pueden ser transformados en fenoles volátiles durante la fermentación. Los

vinilfenoles (4-vinilguayacol, 4-vinilfenol) en vinos blancos, y etilfenoles (4-etilguayacol, 4-etilfenol) en vinos tintos, son cuantitativamente los fenoles volátiles más importantes identificados en los vinos (Singleton y Esau, 1969; Etievant, 1981; Chatonnet y col., 1997). Son responsables, generalmente, de aromas desagradables, descritos frecuentemente como olor a animal, establo, caballo, medicinal, etc, cuando se presentan por encima de su umbral de detección. Se producen principalmente durante el envejecimiento del vino, sobre todo en vinos envejecidos en madera. Las levaduras que con más frecuencia aparecen en vinos tintos de Burdeos con estos aromas pertenecen a distintas especies de los géneros *Brettanomyces* y *Dekkera* (Chatonnet y col., 1992).

Chatonnet y col, (1997), han demostrado que concentraciones de 1 g/L de procianidinas inhiben la capacidad de las bacterias lácticas en general, y *Lactobacillus plantarum* en particular de formar etilfenoles, sin embargo los compuestos polifenólicos no tienen la capacidad de inhibir a algunas cepas de *Brettanomyces bruxellensis*. Una vez que la fermentación alcohólica o maloláctica se ha completado, estas levaduras pueden crecer fácilmente con las trazas de azúcares residuales.

Trabajos previos (Chatonnet y col., 1993), demostraron, que *S.cerevisiae* puede decarboxilar ácidos cinámicos (ferúlico y cumárico), dando lugar a fenoles volátiles. Se ha comprobado (Goodey y Tubb, 1992, Gramatica y col., 1982), que la enzima responsable de esta transformación tiene mayor afinidad por el éster del ácido p-cumárico. Esta enzima presenta actividad cinamato decarboxilasa, y es estereoespecífica, con mayor afinidad por los isómeros trans. Además han comprobado que la actividad es estrictamente intracelular, y con un pH óptimo de alrededor de 6,5. Dedujeron también que es una actividad constitutiva, y limitada a la fermentación alcohólica. Por tanto, indican que no es posible que se sinteticen vinilfenoles en vinos secos almacenados en presencia de levaduras. Esta actividad esta inhibida por los oligómeros de procianidina (Delfini y col., 1999), por lo que es más frecuente en vinos blancos que en rosados, y en estos más que en los tintos.

Algunos fenoles carboxílicos pueden inhibir el crecimiento de bacterias lácticas (Riberau-Gayon y col., 1985, Stead, 1993). Recientemente Reguant y col, (2000), han

demostrado que la inhibición del crecimiento de *Oenococcus oeni* depende de la concentración de polifenoles y del tipo de compuesto que se trate. La fermentación maloláctica se estimula en presencia de catequina y quercetina, pero este aumento es menor si en el medio se incrementa la cantidad de ácido p-cumárico. Comprobaron además, que el ácido gálico disminuye o inhibe la formación de ácido acético, con lo que los vinos resultantes presentan una menor acidez volátil.

La inhibición del crecimiento debida fundamentalmente a los ácidos hidroxycinámicos afecta también al crecimiento de muchas especies de levadura, incluida *Saccharomyces cerevisiae*. El ácido ferúlico presenta el mayor efecto inhibitorio, mientras que el ácido cafeico el menor (Stead, 1995).

No existen muchos trabajos en la bibliografía sobre la influencia de la cepa de levadura empleada durante la fermentación en la concentración de los compuestos fenólicos en el vino. Almela y col., (1991), estudian el efecto de dos cepas distintas de *Saccharomyces cerevisiae* en forma de levaduras secas activas, durante el transcurso de la fermentación sobre la concentración de distintos ácidos fenólicos libres. Comprobaron que había diferencias en el vino, según la cepa de levadura empleada, en la concentración de los ácidos vainillínico y ferúlico principalmente. Compararon los resultados obtenidos con estudios previos similares (García y col., 1986) en vinos de la misma variedad pero con fermentación espontánea, y comprobaron que el contenido final de los ácidos fenólicos libres fue menor con la fermentación espontánea.

Ferrari y col, (1997), en un estudio de numerosas cepas comerciales de *Saccharomyces cerevisiae*, comprobaron que dependiendo de la cepa de levadura empleada se aumentaban algunas características de calidad de los vinos tintos, entre los que se encontraban los compuestos fenólicos.

La influencia de la fermentación maloláctica sobre la composición fenólica en vinos tintos fue determinada por Amati y col., (1998). Estos autores demuestran que la fermentación maloláctica modifica la concentración y la evolución de los polifenoles

durante el envejecimiento del vino. Comprobaron que los vinos que habían sufrido la fermentación maloláctica presentaban menor concentración de fenoles totales, antocianos, catequinas, y proantocianidinas. Estos vinos presentaban mayor porcentaje de malvidín-3-glucósido y menor porcentaje de peonidín-3-glucósido y de antocianidinas aciladas.

Gómez-Cordovés y col., (1981), estudian el efecto de diferentes levaduras incluída *Saccharomyces cerevisie* sobre distintos compuestos no flavonoideos presentes en los mostos, así como la influencia que sobre estos compuestos ejercen las levaduras de flor. Además llevan a cabo la misma experiencia en un medio sintético. Tras la fermentación se produce una disminución del siringaldehído y de la p-vainillina, así como el aumento y la aparición de distintos ácidos benzoicos y cinámicos. Comprueban además la desaparición del siringaldehído en medio sintético.

Cuinier (1988), recoge las experiencias que distintos autores han llevado a cabo sobre la influencia de la cepa de levadura empleada durante la fermentación en la obtención de vinos tintos. Todos ellos han demostrado la influencia de la levadura en la intensidad colorante y en el índice de polifenoles totales.

Barcenilla y col., (1989), demostraron que la cepa de levadura empleada en la fermentación, influía en el contenido fenólico del vino, sobre todo en la formación de triptofol y tirosol.

1.4.2.4.b Efecto del envejecimiento con levaduras en la composición polifenólica de los vinos

La práctica totalidad de trabajos que se han llevado a cabo para determinar los cambios que se producen en la composición fenólica de los vinos envejecidos con levaduras, se han hecho en vinos de crianza biológica, y sólo en muy pocos casos se ha estudiado el efecto del envejecimiento con las lías en vinos espumosos elaborados por el método tradicional.

Barón y col., (1997), estudiaron el pardeamiento y los cambios que se producían en los fenoles no flavonoideos y en los derivados monoméricos y diméricos de los 3-flavanoles durante el envejecimiento biológico, de vinos de Jerez. Principalmente encontraron una disminución de los monómeros y dímeros de los 3-flavanoles. Una de la hipótesis que proponen para explicar este hecho, es que estos compuestos, podrían ser adsorbidos en las paredes de las levaduras de flor, como se ha descrito para otros compuestos presentes en el vino (Lafon-Lafourcade, 1984, Riberau-Gayón, 1985). De esta forma sugieren la posibilidad del empleo de paredes de levaduras, para evitar el pardeamiento de los vinos. Esto unido con la protección al aire que juega el velo de levaduras, explicaría el hecho de que en este tipo de vinos no se produzca un excesivo pardeamiento. Esta explicación, también la proponen Fabios y col., (2000), en un trabajo posterior llevado a cabo también en vinos de crianza biológica, para explicar la resistencia que presentan estos vinos a la oxidación.

La adsorción de compuestos fenólicos a las paredes de las levaduras es la explicación que Somers y col. (1987), atribuyen a la disminución en un 20% del total de hidroxycinamatos durante la fermentación alcohólica del vino.

Ibern-Gómez y col., (2000), han estudiado recientemente, el efecto del tiempo de envejecimiento con las levaduras en vinos espumosos de cava elaborados con variedades de uvas blancas. Han comprobado que durante este periodo de tiempo se producen cambios de color debidos a la oxidación de los compuestos fenólicos. Además determinaron que estos cambios dependían de la variedad de uva empleada. Los vinos Chardonnay, resultaron ser más susceptibles a la oxidación que los obtenidos con las variedades autóctonas del Penedés (Macabeo, Xarel.lo y Parellada). Los hidroxycinamatos, especialmente el trans, y cis-caftarico, fueron el grupo de fenoles más susceptibles a la oxidación. El aumento del pardeamiento lo observaron especialmente después de 15 meses de envejecimiento en todos los vinos espumosos estudiados, e indican que podría deberse a la liberación de compuestos fenólicos adsorbidos a las paredes de las levaduras como consecuencia del proceso de autólisis.

Riberau-Gayón y col., (2000), sin embargo, afirman que por muy largo que sea el tiempo de permanencia del vino de Champagne en contacto con las levaduras, el vino se conserva y envejece perfectamente, sin sufrir ningún tipo de alteración. Indican que las levaduras confieren un efecto protector al vino ya que actuaría de forma similar a un tampón de oxidación-reducción. Esto es así hasta que se produce el degüelle, tras este proceso, pueden producirse defectos en el vino debidos fundamentalmente a fenómenos de oxidación y/o reducción. El degüelle causa un choque oxidativo, ya que el potencial redox puede incrementarse bruscamente en 400mV durante esta operación.

1.4.3 Evolución de los compuestos fenólicos durante el envejecimiento de los vinos.

Durante el desarrollo y maduración de la uva disminuye el contenido de ésteres hidroxycinámicos. (Romeyer y col., 1983, Lee y Jaworski, 1989, Singleton y col, 1986). Durante la elaboración y conservación del vino se produce una hidrólisis lenta de los ésteres encontrándose en el vino simultáneamente, ácidos en estado libre y combinado.

Somers y col. (1987) comprueban que en los vinos blancos durante la conservación, se produce una disminución en los ésteres fenólicos, y un aumento de la concentración de los ácidos cafeico y p-cumárico, así como de sus ésteres etílicos.

Una vez que el vino ya ha sido embotellado, se van a producir reacciones no oxidativas. En estas reacciones van a participar los carbocationes formados a partir de las procianidinas junto con las antocianinas condensadas, y además se va a producir la polimerización de taninos. Si la temperatura es ligeramente alta promueve estas reacciones y es responsable de un envejecimiento acelerado. (de Ribereau-Gayón y col., 2000).

Durante el envejecimiento se va a producir la modificación del color del vino. Estas transformaciones son complejas ya que son muchas las sustancias que van a estar implicadas. Principalmente se deben a combinaciones y condensaciones antociano-tanino. Estas combinaciones son aceleradas por la oxidación, ya que los compuestos fenólicos

sufren modificaciones por la acción del oxígeno del aire sobre todo en presencia de iones metálicos que actúan como catalizadores.

Los antocianos libres son muy susceptibles de sufrir reacciones de oxidación, transformándose en compuestos con tonalidades amarillas e incluso incoloros. La oxidación de estas moléculas depende de la temperatura, del pH y la composición del medio.

La oxidación de procianidinas conduce a la formación de peróxido de hidrógeno, que a su vez oxida al etanol, para dar etanal. El etanal se fija a los antocianos y taninos, como molécula intercaladora, dando una molécula condensada de color malva, las moléculas formadas tras la oxidación son por tanto más coloreadas, con tonalidades mas oscuras que los antocianos. La coloración va a depender de la concentración de oxígeno, con oxígeno la coloración varía de rojo a malva, y sin oxígeno y con alta temperatura el color hacia tonos más anaranjados.

Durante el envejecimiento del vino la composición polifenólica se hace cada vez más compleja, y esto va a afectar al color. Los antocianos libres van a ir desapareciendo, siendo sustituidos progresivamente por compuestos poliméricos coloreados. Esto provoca el cambio de coloración desde el rojo intenso a rojo-teja, naranja o marrón. Para explicar este fenómeno se han postulado distintos mecanismos como son la formación de una base de xantilio (Jurd y col., 1960), condensación entre antocianinas y vinilfenol (Fulcrand y col., 1998), o condensación indirecta mediada por acetaldehído (González-Sanjosé y col., 1990, Di Stefano y col., 1991; Fulcrand y col., 1996). Recientemente también se ha caracterizado un derivado del ácido pirúvico (Fulcrand y col., 1998), y un derivado del malvidín-3-glucósido llamado vitisina B (Bakker y col., 1997). Fulcrand y col., (1998), y Francia-Aricha y col., (1997), han encontrado otros pigmentos formados por condensación entre el malvidín-3-glucósido, y dímeros de 3-flavanoles.

En los vinos envejecidos en bodega, se va a producir una extracción de los compuestos fenólicos de la bodega, como distintas lactonas y fenoles volátiles, que han sido descritos como responsables del “aroma a madera”, de estos vinos (Singleton, 1995).

1.4.4 Importancia de los compuestos fenólicos en el vino

1.4.4.1 Influencia en la calidad sensorial

La calidad de los alimentos de origen vegetal, y por tanto del vino, está relacionada de manera mas o menos directa con su contenido en compuestos fenólicos.

Este grupo de compuestos va a contribuir de una forma muy importante a las características sensoriales de los vinos como son color, astringencia, amargor y aroma. Estas propiedades se van a transmitir desde el producto original a los procesados, y dependen del contenido inicial, y de los distintos tratamientos a los que se haya sometido el producto (Spanos y Wrolstad, 1992, Hernández y col., 1995).

La composición fenólica, a su vez, suele ser característica de cada especie vegetal, e incluso de cada variedad, por lo que en muchos casos se utiliza el análisis de compuestos fenólicos en la detección de adulteraciones de alimentos de origen vegetal (García-Varela y col., 1993).

Todos los vinos, blancos, rosados o tintos, tienen una base cromática amarilla o sus precursores inicialmente incoloros (flavanoles, catequinas y leucoantocianos). Con el paso del tiempo estos compuestos se polimerizan y aumentan su color amarillo. Los rosados y tintos tienen además un componente rojo (antocianos) que es inestable ya que con el paso del tiempo, se vuelve pardo y disminuye de intensidad. La evolución del color en los vinos tintos es un fenómeno complejo, en el que, como ya se ha comentado en anteriores secciones intervienen además de los antocianos otros compuestos fenólicos flavonoideos. Durante el almacenamiento de los vinos se van a producir hidrólisis, condensaciones y polimerizaciones de estos compuestos, que van a ser los responsables de la coloración de los vinos envejecidos.

La asociación antocianos-procianidinas parece que actúa como factor estabilizador del color (Mazza y Brouillard, 1990; Liao y col., 1992). Además contribuyen al

envejecimiento de los vinos Haslam, (1980). Algunos ácidos benzoicos y cinámicos participan también en la intensificación de algunas tonalidades de color amarillo (González-Sanjosé y col., 1990).

Además los compuestos fenólicos pueden sufrir reacciones de pardeamiento enzimático con lo que se va a modificar el color final de los vinos. Los compuestos fenólicos más susceptibles de sufrir la acción de las oxidasas (peroxidasas y polifenoloxidasas) son la (+)-catequina, la (-)-epicatequina y derivados del ácido cafeico, así como otros compuestos que tengan grupos o-difenol (Okamura y Watanabe, 1981; Gunata y col., 1987, Fernández-Zurbano y col., 1997). El pardeamiento enzimático provoca cambios en el color conduciendo a la aparición de taninos pardos en el caso de vinos blancos, y de tonalidades rojas en el caso de vinos tintos, lo que en la mayoría de los casos supone un deterioro en la calidad del producto y puede llegar a producir alteraciones en el sabor y la textura, haciendo a los vinos más astringentes (Singlenton, 1982).

Muchos de los compuestos fenólicos contribuyen en gran medida a la oxidación enzimática y oxidativa de pardeamiento de los mosto, y vinos blancos, siendo responsables de la modificación de las características de estabilidad de los vinos blancos durante el almacenamiento (Simpson y col., 1982). Para evitarlo se utilizan distintos tratamientos, algunos de cuales se conocen y emplean desde hace tiempo, como el uso de polivinilpolipirrolidona (PVPP), gelatina, caseína, albúmina de huevo o bentonita. El empleo de estos métodos clásicos conlleva algunas desventajas como cambios en el flavor del vino, el coste, y las pérdidas de volumen de vino durante el tratamiento. Por ello, actualmente se está investigando el empleo de distintas enzimas libres (Dry y Robinson, 1994; Rathjen y Robinson, 1992), y más recientemente inmovilizadas (Servili y col., 2000), que han presentado buenos resultados, disminuyendo algunos de los compuestos fenólicos más implicados en este proceso.

Hay ciertos compuestos fenólicos responsables del sabor amargo (Thorngate, 1997). El amargor de un vino es debido principalmente a los oligómeros de procianidinas (Porter y col., 1991), aunque también son responsables algunos ácidos hidroxicinámicos.

La astringencia en los vinos es debida a los polímeros de 3-flavanoles (procianidinas o taninos condensados). Se produce por la precipitación de glicoproteínas y mucopolisacáridos de la saliva al unirse a estos compuestos, que origina una sensación de extrema sequedad en la boca. Esta propiedad aumenta con el grado de polimerización y se va perdiendo a medida que el vino envejece y va adquiriendo suavidad y finura (Baigorri y col., 1982).

Los compuestos fenólicos no contribuyen de manera fundamental al aroma de los vinos. Sin embargo, algunos de ellos pueden influir negativamente, y de forma muy acusada en el aroma, siendo responsables de defectos en el mismo. Son fundamentalmente los vinil y etilfenoles, resultado de la acción de los microorganismos sobre algunos ácidos hidroxicinámicos. Algunos compuestos fenólicos, no obstante, comunican al vino aromas agradables como la vainillina (Singleton y Noble, 1976).

Uno de los efectos negativos de los compuestos fenólicos en los vinos es su intervención en la aparición de turbidez y precipitaciones.

Otra de las acciones negativas que se ha atribuido a los compuestos fenólicos, es la capacidad de modificar el aroma de los vinos por interacción con los compuestos responsables y su posterior eliminación durante los tratamientos de filtración o precipitación. Dufour y col., (1999), en un medio hidroalcohólico al que añaden distintos compuestos fenólicos y volátiles, comprueban que la interacción con las catequinas y taninos es baja, sólo el limoneno está influido significativamente. Sin embargo, no descartan la posibilidad de pérdidas de aroma en el vino cuando se producen reacciones de polimerización de estos compuestos durante el envejecimiento. Escalona y col., (2001) indican que los cambios en los compuestos volátiles de los vinos, están relacionados con la evolución de los compuestos fenólicos.

1.4.4.2 Acciones farmacológicas

Los compuestos fenólicos presentan una amplio espectro de propiedades terapéuticas, además de una baja toxicidad. Esto hace que en los últimos años haya crecido el interés por su estudio, que se traduce en un importante aumento de trabajos científicos que tratan de encontrar nuevos compuestos de este tipo en los vinos, y elucidar tanto su estructura como su potencial efecto farmacológico.

Hacia los años cincuenta, Masquelier pone de manifiesto por primera vez, algunas de las propiedades de las procianidinas del vino. A partir de este momento se reconoció especialmente a los flavonoides un efecto cardioprotector, incluso la citrina, mezcla de dos flavonoides, la hesperidina y la eriodictina, recibió el nombre de Vitamina P, o factor de permeabilidad vascular. Poco después, Bastide y col., (1968) comprueban que los antocianos mejoran la agudeza visual y la visión nocturna, al favorecer la regeneración de las células retinianas.

En 1982, Masquelier comprobó que las procianidinas son sustancias fisiológicamente muy activas que combaten la ateromatosis, enfermedad crónica de las arterias y principal responsable del infarto de miocardio. A nivel de las paredes arteriales estabilizan las fibras de colágeno y evitan una producción exagerada de histamina, que aumenta la permeabilidad de las paredes. Actualmente las catequinas y procianidinas se aconsejan en el control de la úlceras gástricas causadas por exceso de histamina en la mucosa gástrica.

A las cumarinas y a algunas flavonas y taninos se les atribuye una acción antimutagénica y anticarcinogénica (Mabry y Ulubelen, 1980; Pourrat, 1980). Los ácidos cinámicos pueden tener un papel importante como anticancerígenos, por inhibición de la formación de compuestos que presentan NO₂ en su molécula. La acción anticancerígena de las procianidinas se debe a que son capaces de captar radicales libres (Laparra, 1990; Arpentina y col., 1992). Este mismo papel es el que se atribuye al resveratrol que presenta

actividad preventiva en los tres estadios mas importantes de la carcinogénesis (Jang y col., 1997)

Al resveratrol se le han atribuido otras propiedades beneficiosas como la de reducir el riesgo de enfermedades coronarias (Frankel y col., 1993), inhibir la agregación plaquetaria humana in vitro (Orsini y col., 1997) y modular la síntesis de eicosanoides (Kimura y col., 1985; Pace-Asciak y col., 1995). Recientemente, Gehm y col., (1997), han encontrado propiedades estrógenicas que pueden también contribuir a los efectos cardioprotectores descritos por el consumo de vino.

Ghiselli y col., (1998), afirman que el efecto protector del vino se debe a la captación de radicales libres, inhibición de la oxidación de lipoproteínas, y de la agregación plaquetaria, y comprueban que esto se debe principalmente a la fracción de antocianos, que es la más abundante en vinos tintos, aunque no excluyen la posibilidad de sinergismos con otros compuestos fenólicos.

Goldberg y col., (1999), creen sin embargo que los flavonoides poliméricos como antocianinas y procianidinas encontradas en vinos tintos tienen una gran potencialidad biológica "in vivo", pero indican que es muy difícil que estos compuestos puedan ser absorbidos en el tracto intestinal, debido a su elevado peso molecular.

Estudios recientes (Pedrielli y col., 2001; Burda y Oleszec, 2001) han demostrado la influencia de la estructura, y del solvente en el que se encuentre el flavonoide en su capacidad de actuar como antioxidante y como captador de radicales libres.

Se ha demostrado la actividad antimicrobiana y anivírica de algunos ácidos hidroxicinámicos y derivados como los ácidos cafeico, clorogénico, rosmarínico, así como algunos ésteres heterosídicos del primero (McClure, 1975; Pourrat, 1980; Herrmann, 1990 a y 1990 b). La actividad antimicrobiana del ácido benzoico y sus derivados es conocida desde hace tiempo (Dumenil y col., 1980). También se ha descrito la acción antifúngica de los taninos (Delaveau y Vidal-Tessier, 1986). Recientemente Edeas y Lindenbaum (2000),

han comprobado los efectos protectores de varios compuestos flavonoideos, derivados del ácido ferúlico principalmente, frente al virus de la inmunodeficiencia humana (HIV).

1.4.5 Metodología analítica empleada en el análisis de los compuestos fenólicos

El vino constituye una compleja matriz, en la que los compuestos fenólicos se encuentran en baja concentración, sin embargo, las técnicas analíticas actuales permiten determinar su presencia de manera individualizada.

Es necesario elegir las condiciones de extracción que separen la matriz de los compuestos fenólicos, que posteriormente se determinarán por otros métodos.

1.4.5.1 Preparación de la muestra

El análisis de los compuestos fenólicos de la uva requiere una etapa previa de extracción. Se realiza por maceración con distintos disolventes, como metanol, etanol, agua, etc., en frío o en caliente. A veces es recomendable hacer una purificación previa con un disolvente no polar, como éter de petróleo, para eliminar grasas, ceras, clorofilas y carotenos.

1.4.5.2 Extracción

No hay un método totalmente satisfactorio que los extraiga de forma exhaustiva y no produzca alteraciones, ya que suelen ser fácilmente oxidables.

La temperatura a la que se realice la extracción va a influir de manera muy importante. Se recomienda no sobrepasar 45-50 °C, ya que temperaturas elevadas, favorecen la polimerización, hidrólisis, oxidación, etc. Oszmiantri y col., (1986) observan un aumento de ácido gálico extraído de las uvas tras 20 h. de maceración a 35 °C, que procede de los galatos de epicatequina y catequina y de otros ésteres.

No existe un valor de pH para conseguir mayor rendimiento de extracción, aunque algunos autores (Fleuriet y Macheix, 1972; Salagoity-Auguste y Bertrand, 1984) separan selectivamente compuestos fenólicos ácidos de los demás fenoles del vino tinto, cambiando el pH antes de la extracción con acetato de etilo.

1.4.5.3 Purificación y concentración.

El líquido obtenido por maceración de las partes sólidas, en el caso del análisis de los compuestos fenólicos contenidos en hollejos y/o pepitas, o el vino directamente, se somete a una etapa de purificación y concentración, que generalmente consiste en una extracción líquido-líquido, normalmente con éter etílico o acetato de etilo (Gómez-Cordovés y col., 1978; Wulf y Nagel, 1980; Estrella y col, 1983; Barcenilla y col., 1989; entre otros) o mezcla de ambos (Fernández de Simón y col, 1990, Peña y col., 2000).

Se puede hacer también un fraccionamiento del extracto mediante columnas de poliamida, Sephadex, sílice, celulosa, etc. (Cheynier y Rigaud, 1986; Lee y Jaworski, 1989; Kanz y Singleton, 1990; Ricardo da Silva y col., 1990). Otra opción es el empleo de la extracción en fase sólida (SPE) mediante la utilización de pequeños cartuchos de C₁₈, (González-Sanjosé y Pérez-Illarbe, 1990; Picinelli y col., 1996), y cartuchos de poliamida o fenilo (Hollborn y col., 1990).

Algunos autores no hacen ningún tipo de preparación de la muestra antes de su análisis cromatográfico. De esta forma, por inyección directa López y col., (2001), han determinado ácido gálico, tran-resveratrol, quercetina y rutina en vinos tintos.

1.4.5.4 Análisis

Una vez obtenido el extracto purificado, hay dos posibles vías de análisis:

1. Valoración conjunta de distintos grupos de compuestos fenólicos a partir del extracto total.

2. Someter el extracto a técnicas de separación, normalmente cromatográficas, para cuantificar los compuestos individualizados.

1.4.5.4.a Análisis global

El análisis global se basa en el empleo de distintos métodos espectrofotométricos, basados en las propiedades químicas de las distintas familias o grupos de compuestos fenólicos. De esta manera se pueden determinar:

Polifenoles totales, por medida de la Absorbancia a 280 nm (Ribéreau-Gayon y Peynaud, 1971), o mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965)

Catequinas: por reacción con p-vainillina en medio ácido (Swain y Hillis, 1959)

Taninos condensados o proantocianidinas, por hidrólisis en butanol/ácido clorhídrico, según el método de Batesmith (1954).

Los resultados se expresan en el compuesto mas representativo o mas estable de la familia fenólica.

1.4.5.4 b Análisis individualizado

Distintas técnicas analíticas se han empleado para el análisis de los compuestos fenólicos de manera individualizada.

La cromatografía en papel y la cromatografía en capa fina (TLC), que fueron utilizadas para el análisis de este tipo de compuestos (Gómez-Cordovés y Khayyat, 1981; Romeyer y col., 1983; Alonso y col., 1986; Barcenilla y col., 1989; etc) se han ido remplazando por la cromatografía líquida de alta eficacia que presenta una mayor resolución, y posibilita la cuantificación. Otras técnicas que se han empleado son la espectroscopía infrarroja (Foo, 1981), la cromatografía de partición centrífuga (Marston y

col., 1990; Okuda y col., 1990), y la electroforesis capilar (CE), (Fernández de Simón y col., 1995; García-Viguera y Bridle, 1995). Estos últimos autores compararon este método de análisis con la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), para el análisis de compuestos fenólicos no flavonoideos en vino y concluyen que esta última técnica, aunque requiere menor tiempo de análisis, necesita concentrar las muestras el doble, para alcanzar el mismo límite de detección que por HPLC. Además el análisis por HPLC, presenta mayor robustez, y es más versátil en términos de fase estacionaria, empleo de modificadores orgánicos, etc. Vanhoenacker y col., (2001) compararon las técnicas de HPLC-MS, y CE-MS para el análisis de compuestos fenólicos en vinos tintos extraídos con éter dietilo. La robustez, y la facilidad de acoplamiento a un detector de espectrometría de masas, hace que el método de HPLC-MS, resulte muy adecuado para el análisis de este tipo de compuestos, y el empleo de un tipo de fragmentación por disociación inducida por colisión (CID), proporciona información estructural sobre compuestos que no pueden ser identificados por su espectro de UV.

1.4.5.4.c Cromatografía de líquidos de alta eficacia

La cromatografía de líquidos de alta eficacia es actualmente la técnica analítica más empleada para el análisis de distintos grupos de fenoles como ácidos fenólicos (Cartón y col, 1991), hidroxycinamatos (Nagel y col., 1979; Herrick y Nagel, 1985; Somers y col., 1987; Peña y col., 2000), y flavonoides (Lea, 1980; Alonso y col., 1987; Wightmaan y col., 1997; Ricardo da Silva y col., 1990; Goldberg y col, 1998; etc) en mostos y vinos.

Generalmente se trabaja en fase inversa, con columnas cuyo relleno son fases ligadas de organosilanos (octadeciltriclorosilano, octiltriclorosilano, o feniltriclorosilano) o pequeñas partículas de sílice. La más empleada es la octadecil-silil-ligadas (C₁₈). La fase móvil más utilizada es una mezcla de acetonitrilo/agua o metanol/agua, conteniendo o no un ácido (acético, fórmico, fosfórico, etc.) en pequeña concentración..

El detector más comúnmente empleado para el análisis de compuestos fenólicos es el de fotodiodos alineados (DAD), con el que se puede elegir el máximo de absorbancia

para cada grupo de compuestos. Este tipo de detector permite identificar un compuesto no sólo por su tiempo de retención, sino también por su espectro ultravioleta. Las características cromatográficas y espectrales de los compuestos fenólicos pueden ser utilizadas para la identificación de picos desconocidos, por comparación con sustancias patrón que tengan un espectro similar (Horig y Wrolstad, 1990 a y 1990 b; Bailey y col., 1991; Pérez-Ilzarbe y col., 1991). Bartolomé y col., (1993) comprobaron la utilidad del empleo del detector de fotodiodos alineados para conocer la estructura de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular.

Actualmente cada vez se está extendiendo más el empleo del detector de espectrometría de masas para la identificación de este tipo de compuestos (Lamuela-Raventós y Waterhouse, 1994; Betés-Saura y col., 1996; Cameira dos Santos y col., 1998; Revilla y col., 1999 entre otros), incluso se están empleando acoplamientos MS-MS, para elucidar la estructura de algunos compuestos fenólicos, (Badershneider y Winterhalter, 2000 y 2001). Estos últimos autores también han empleado otras técnicas de identificación como la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR), el dicroísmo circular (CD), y la dispersión óptica rotatoria (ORD).

2-Materiales y Métodos

2.1 Descripción de los vinos estudiados

2.1.1 Vinos espumosos elaborados a partir de mezcla de variedades blancas, con cinco cepas de levadura distintas y adición o no de bentonita en el licor de tiraje.

2.1.1.1 Elaboración de los vinos espumosos

La elaboración de estos vinos se llevó a cabo en condiciones industriales en la bodega Castellblanch, acogida a la denominación específica Cava, siguiendo el mismo protocolo que se utiliza habitualmente en la industria.

A partir de un vino base mezcla de las variedades Macabeo (49%), Xarel.lo (14 %), y Parellada (37 %), se elaboraron un total de 10 vinos espumosos distintos utilizando 5 cepas diferentes de levaduras. A 5 de estos vinos les fue añadida bentonita en el licor de tiraje, mientras que los otros cinco se prepararon sin bentonita. En total se elaboraron con el mismo vino base, 10 lotes de 70 botellas de cada uno de los vinos espumosos. En la **figura 7**, se representan los distintos puntos de toma de muestra en los que se llevaron a cabo los análisis.

2.1.1.1 a Cepas de levadura empleadas en la segunda fermentación

Se utilizaron 5 cepas de levadura del género *Saccharomyces*, una de ellas perteneciente a la empresa elaboradora (Castellblanch S. A.), dos de la colección del Instituto de Fermentaciones Industriales, otra cedida por el Instituto Catalán de la Viña y el Vino (INCAVI), y otra comercial proporcionada por la empresa L'Allemand. La especie a la que pertenecen, así como su procedencia se detallan en la **tabla 1**.

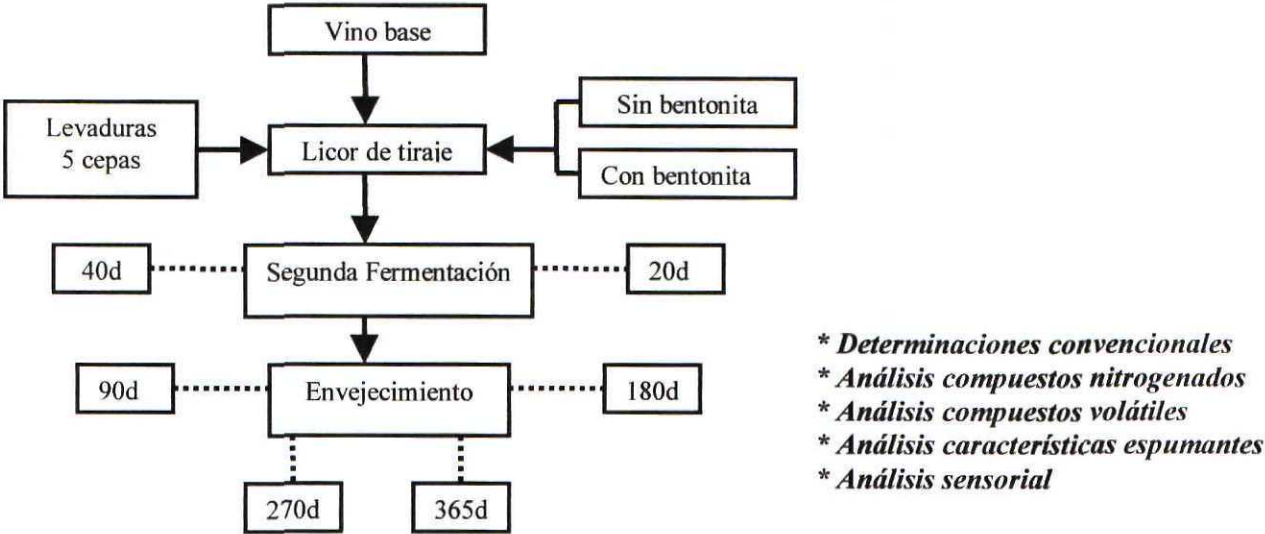


Figura 7. Etapas seguidas en la elaboración de los vinos espumosos, puntos de toma de muestra, y determinaciones realizadas.

Tabla 1. Cepas utilizadas para llevar a cabo la segunda fermentación.

Cepa	Especie	Procedencia
EC1118	<i>Saccharomyces bayanus</i>	L' Allemand
IFI-473	<i>Saccharomyces oviformis</i>	IFI
IFI-475	<i>Saccharomyces oviformis</i>	IFI
P-29	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	INCAVI
J	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Castellblanch S.A.

2.1.1.1 b Preparación del pie de cuba y realización del tiraje.

A partir de cultivos jóvenes que habían sido conservados en agar extracto de malta, se realizó una siembra en 5 mL de mosto estéril, y se incubó 48 h a 25 °C. Con estos 5 mL se hizo una siembra en 100 mL del mismo medio y en las mismas condiciones. 15 mL de este medio, se pasaron a un matraz con 300 mL de medio fresco con los que se inocularon 6 litros de vino base con sacarosa, previamente filtrado a través de membranas de 0,45 µm. Se dejó crecer durante 4 días a 25 °C agitando el cultivo tres veces por día. Este mismo procedimiento se utilizó para preparar el inóculo de todas las cepas.

El vino base se inoculó con un licor de tiraje compuesto por 20 % de sacarosa, y con una concentración de levaduras de aproximadamente 6,7 % del volumen total. La población de levaduras del inóculo tenía aproximadamente $1 \cdot 10^6$ cel./mL. Se elaboraron dos lotes, uno sin adición de bentonita, y otro al que se le añadió a la mezcla de tiraje una solución de bentonita al 1 %

2.1.1.1 c Toma de muestras.

Se tomaron muestras para el análisis del vino base, de los vinos durante la segunda fermentación (20 y 40 días) y de los vinos espumosos durante el envejecimiento (90, 180, 270, y 365 días). En cada punto de toma de muestra se

retiraron 8 botellas por cepa de levadura, 4 de vinos preparados utilizando bentonita, y otros cuatro sin ella.

Las cuatro botellas correspondientes a cada variable y cepa se mezclaron y homogeneizaron, y el vino se centrifugó a 8000 g durante 15 minutos, a 5 °C. El sobrenadante se utilizó para llevar a cabo los distintos análisis.

El degüelle, la adición del licor de expedición (2 g sacarosa/L) y el taponado se realizó en la bodega.

2.1.2 Vinos espumosos elaborados con la variedad de uva blanca Parellada.

2.1.2.1 Elaboración de los vinos espumosos

Se han elaborado en condiciones industriales en una bodega del grupo Freixenet S.A 4 vinos base monovarietales a partir de uvas blancas de la variedad Parellada. Dos de ellos (Parellada A1 y Parellada A2), procedían de viñas Parellada sometidas a prácticas vitícolas de sobreproducción (poda en copa, situadas a pocos metros sobre el nivel del mar y en las que se espera obtener un rendimiento superior a los 19000 Kg/Ha). Los otros dos (Parellada B1 y Parellada B2), se han elaborado a partir de uvas procedentes de viñedos Parellada tratados según las prácticas vitícolas consideradas desde antiguo apropiadas para esta variedad (poda en copa, altura de 300 m sobre el nivel del mar y un rendimiento no superior a 15000 Kg/Ha).

2.1.2.1 a Preparación del pie de cuba y realización del tiraje

La preparación del pie de cuba y los tirajes, se ha realizado según las condiciones descritas en el apartado 2.1.1.1. La segunda fermentación se llevó a cabo en todos los vinos con la misma cepa de levadura, y en todos ellos se añadió bentonita al licor de tiraje, con una concentración de 3 g/hL.

2.1.2.1 b Toma de muestras

Se tomaron muestras para los diferentes análisis a los 9, 12, 15, y 18 meses de envejecimiento con las levaduras. En la **figura 8**, se representa de forma esquemática las etapas de elaboración, puntos de toma de muestra, y determinaciones realizadas en estos vinos.

El degüelle, la adición del licor de expedición (2 g sacarosa/L) y el taponado se realizó en la bodega.

2.1.3 Vinos base y vinos espumosos elaborados con las variedades de uvas tintas Trepát, Monastrell y Garnacha.

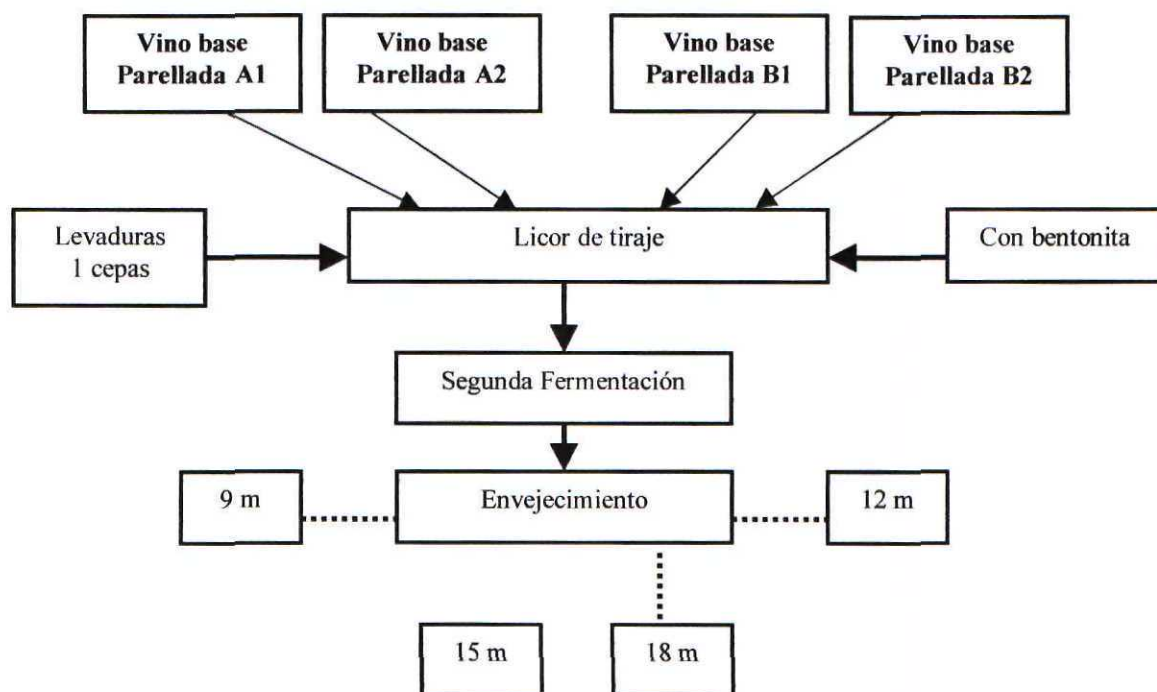
2.1.3.1 Elaboración de los vinos espumosos

Se han elaborado a escala industrial en una bodega del grupo Freixenet S.A., 5 vinos monovarietales con diferentes variedades de uvas tintas, vinificadas en blanco. Dos de ellos se elaboraron con la variedad Trepát (Trepát 1 y Trepát 2), y los otros dos con la variedad Monastrell (Monastrell 1 y Monastrell 2).

El quinto vino base, se elaboró vinificando en rosado, en una bodega acogida a la Denominación de Origen Vinos de Madrid a partir de uvas tintas de la variedad Garnacha.

2.1.3.1 a Preparación del pie de cuba y realización del tiraje

La preparación del pie de cuba y los tirajes, se ha realizado según las condiciones descritas en el apartado 2.1.1.1. La segunda fermentación se llevó a cabo con la misma cepa de levadura, y en todos los vinos, excepto en el elaborado con la variedad Garnacha, se ha añadido bentonita en el licor de tiraje, en una concentración de 3 g/hL.



- * *Determinaciones convencionales*
- * *Análisis compuestos nitrogenados*
- * *Análisis compuestos volátiles*
- * *Análisis compuestos fenólicos de bajo peso molecular*
- * *Análisis características espumantes*

Figura 8. Etapas seguidas en la elaboración de los vinos espumosos Parellada, puntos de toma de muestra, y determinaciones realizadas.

2.1.3.1 b Toma de muestras

Se tomaron muestras para el análisis de todos los vinos base, y de los espumosos respectivos a los 9, 12, 15 y 18 meses de envejecimiento con las levaduras, para los vinos elaborados con las variedades Trepát y Monastrell, y a los 9 y 12 meses, para los vinos elaborados con Garnacha. En la **figura 9**, se representa de forma esquemática las etapas de elaboración, puntos de toma de muestra, y determinaciones realizadas en estos vinos.

El degüelle, la adición del licor de expedición (2 g sacarosa/L), excepto en los vinos espumosos de la variedad Garnacha, a los que no se les añadió licor de expedición, y el taponado, se realizaron en las bodegas correspondientes

2.1.4 Elaboración de vinos base y vinos espumosos por mezcla de variedades de uvas blancas y tintas.

2.1.4.1 Elaboración de los vinos espumosos

Se ha elaborado a escala industrial en una bodega del grupo Freixenet S.A., un vino mezcla (vino base Tipus) de variedades de uvas blancas, Macabeo (58 %), Parellada (36 %) y Xarel.lo (6 %). A partir de este vino base y con los vinos base rosados monovarietales descritos en la sección 2.1.3, Trepát 1, Trepát 2 , Monastrell 1 y Monastrell 2, se elaboraron cuatro vinos base mezcla. Los coupages de vinos base fueron los siguientes:

- Vino base Tipus (50%) y vino base Trepát 1 (50%).
- Vino base Tipus (50%) y vino base Trepát 2 (50 %)
- Vino base Tipus (75 %) y vino base Monastrell 1 (25 %)
- Vino base Tipus (75 %) y vino base Monastrell 2 (25 %)

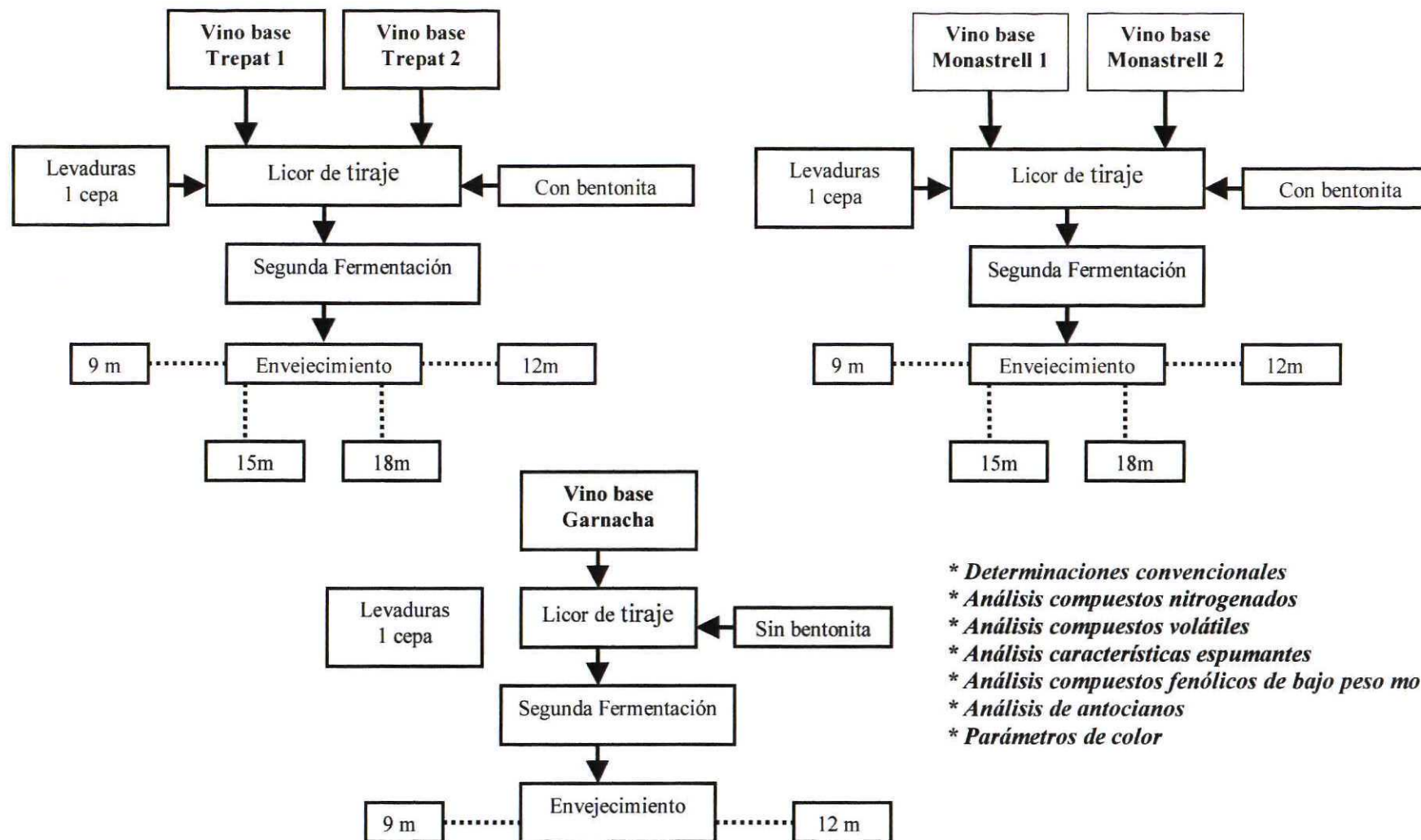


Fig 9. Etapas seguidas en la elaboración de los vinos espumosos con las variedades Trepát, Monastrell y Garnacha. Puntos de toma de muestra y determinaciones realizadas.

2.1.4.2 Preparación del pie de cuba y realización del tiraje

La preparación del pie de cuba y los tirajes, se han realizado según las condiciones descritas en el apartado 2.1.1.1. La segunda fermentación se llevó a cabo con la misma cepa de levadura, y en todos los vinos se añadió bentonita en el licor de tiraje, en una concentración de 3 g/hL.

2.1.4.3 Toma de muestras

Se tomaron muestras para el análisis de todos los vinos base, incluido el vino base mezcla de variedades blancas, y de los espumosos respectivos a los 9, 12, 15 y 18 meses de envejecimiento con las levaduras. En la **figura 10**, se representa de forma esquemática las etapas de elaboración, puntos de toma de muestra, y determinaciones realizadas en estos vinos.

El degüelle, la adición del licor de expedición (2 g sacarosa/L) y el taponado se realizó en la bodega.

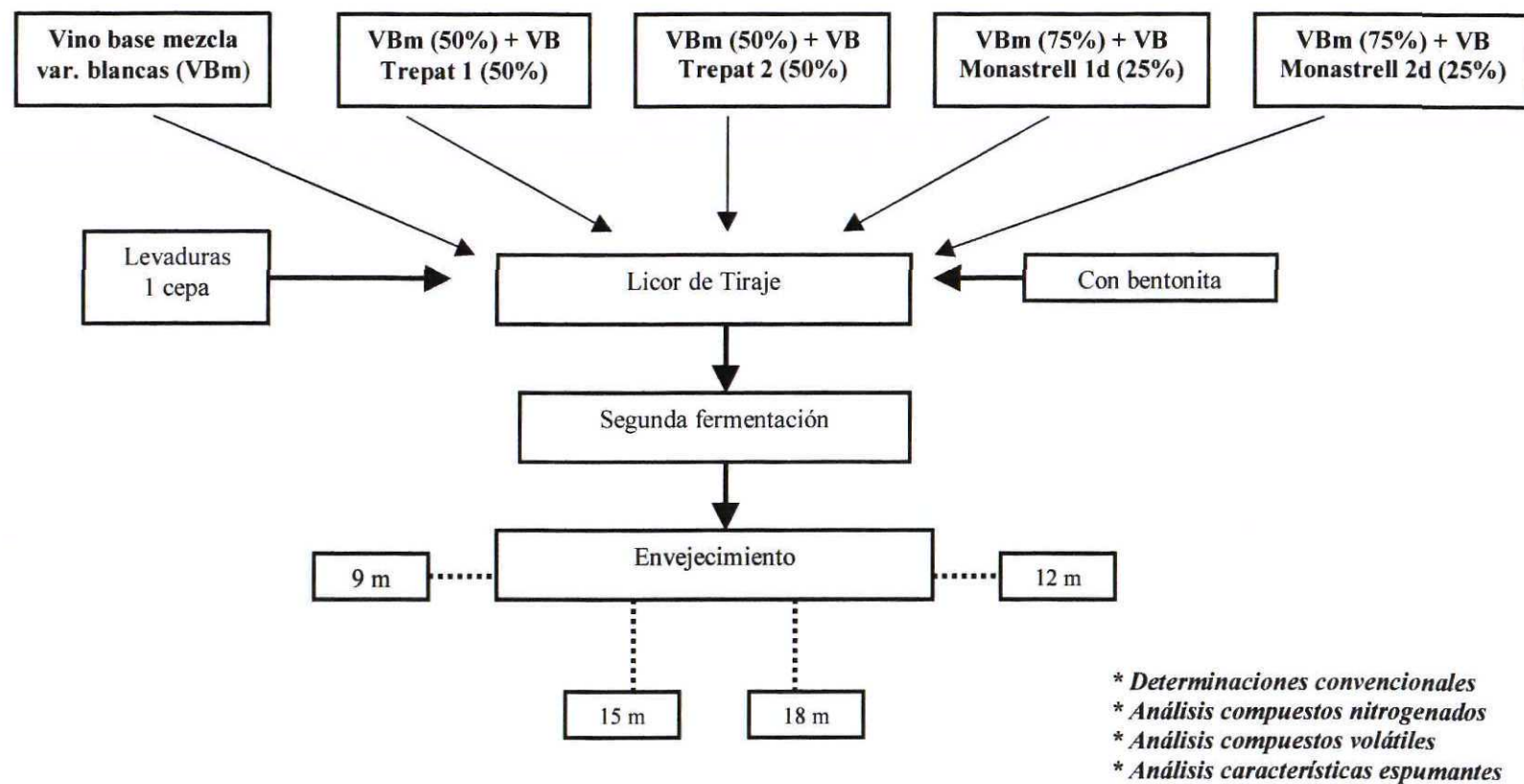


Figura 10. Etapas seguidas en la elaboración de los vinos espumosos de mezcla, puntos de toma de muestra, y determinaciones realizadas.

2.2 Metodología empleada para la determinación de compuestos volátiles, fenoles de bajo peso molecular, y antocianos en los vinos base y espumosos.

El análisis de los compuestos volátiles de los vinos base y de los espumosos estudiados, se ha realizado por cromatografía de gases mediante inyección directa y detección con el empleo de un detector de ionización de llama (DI-GC-FID), en el caso de los volátiles mayoritarios, y con microextracción en fase sólida del espacio de cabeza, previo al análisis cromatográfico, y empleo de un detector de ionización de llama (HS-SPME-GC-FID), o un espectrometrómetro de masas con ionización por impacto electrónico (HS-SPME-GC-EI-MS).

Los distintos compuestos volátiles de los que se disponen de patrones comerciales, y que se van han cuantificado en los vinos analizados se recogen en la **tabla 2**. Se muestra a su vez, el método empleado para su análisis, por inyección directa, o con etapa previa de extracción y concentración.

2.2.1 Análisis de compuestos los compuestos volátiles de los vinos por inyección directa

El análisis de los compuestos volátiles por inyección directa, se ha realizado con dos columnas distintas, y condiciones cromatográficas diferentes.

2.2.1.1 Análisis de los compuestos volátiles por DI-GC-FID, y empleo de una columna cromatográfica microrrellena.

2.2.1.1 a Preparación de la muestra.

A 10 mL de vino se le añadieron 50 μ L de patrón interno, (0,06 g de 3-pentanol preparado en una solución de etanol al 10 %). 1 μ L de esta solución se inyectó en modo split (1/15) en el cromatógrafo de gases. Cada muestra se analizó por duplicado.

Tabla 2. Compuestos volátiles de las soluciones sintéticas preparadas con fines de identificación a través de los tiempos de retención y método seguido para su determinación. DI: inyección directa; HS-SPME: microextracción en fase sólida del espacio de cabeza.

Compuesto	Método analítico empleado
ALCOHOLES	
1-propanol	DI
Isobutanol	DI
2 -metil-1-butanol	DI
3-metil-1-butanol	DI
1-hexanol	DI
Metanol	DI
Cis-3-hexen-1-ol	HS-SPME
ÉSTERES	
Formiato de etilo	DI
Acetato de etilo	DI
Acetato de isobutilo	HS-SPME
Acetato de isopentilo	HS-SPME
Acetato de hexilo	HS-SPME
Butanoato de etilo	HS-SPME
Hexanoato de etilo	HS-SPME
Octanoato de etilo	HS-SPME
Decanoato de etilo	HS-SPME
Succinato de dietilo	HS-SPME
Lactato de etilo	DI
ÁCIDOS	HS-SPME
Ácido hexanoico	HS-SPME
Ácido octanoico	HS-SPME
Ácido decanoico	HS-SPME
OTROS	
γ - butirolactona	HS-SPME
Acetaldehído	DI

2.2.1.1 b Equipo

Se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard M-5890 serie II, equipado con un detector de ionización de llama (FID), y con inyector split/splitless. La separación se realizó en una columna microrrellena 15 % Carbowax 1500 sobre WNAW 80/100, de 4 m. de longitud y 1/8 de μm . de diámetro interno (Supelco Inc., Bellefonte, P.A.).

2.2.1.1 c Condiciones cromatográficas

La separación se llevó a cabo con un gradiente de temperatura que comenzó con el horno a 70 °C durante 10 minutos, para ir aumentando 2 °C/min hasta alcanzar 120 °C. Como gas portador se empleó Helio, con un flujo de 19 mL/min. La temperatura del inyector y del detector fue de 200 °C.

2.2.1.1 d Identificación y análisis cuantitativo.

La medida de las áreas de cada compuesto se llevó a cabo utilizando el programa informático Nelson, (5.0, Perkin-Elmer). La identificación de los distintos compuestos se realizó por comparación de los tiempos de retención relativos al patrón interno de los compuestos de las muestras respecto a las de las soluciones de referencia (**Tabla 3**). La cuantificación se llevó a cabo por comparación del área relativa al patrón interno de cada compuesto con la obtenida en la recta de calibrado correspondiente a cada sustancia patrón, en las mismas condiciones que la muestra problema.

Tabla 3. Tiempos de retención de los compuestos volátiles de la solución sintética preparada con fines de identificación, obtenidos del analisis por inyección directa con el empleo de una columna microrrellena.

Identificación	Compuesto	T _R (min)
1	Acetaldehído	3,15
2	Formiato de etilo	4,98
3	Acetato de etilo	7,03
4	Metanol	8,47
5	1-Propanol	16,64
6	Isobutanol	21,01
7	3-pentanol (patrón interno)	22,10
8	2 + 3 metil-1-butanol	30,31

En la **figura 11**, se muestra el cromatograma correspondiente a la solución de referencia descrita en la tabla 3, analizada con el empleo de la columna microrrellena y en las condiciones descritas en este apartado.

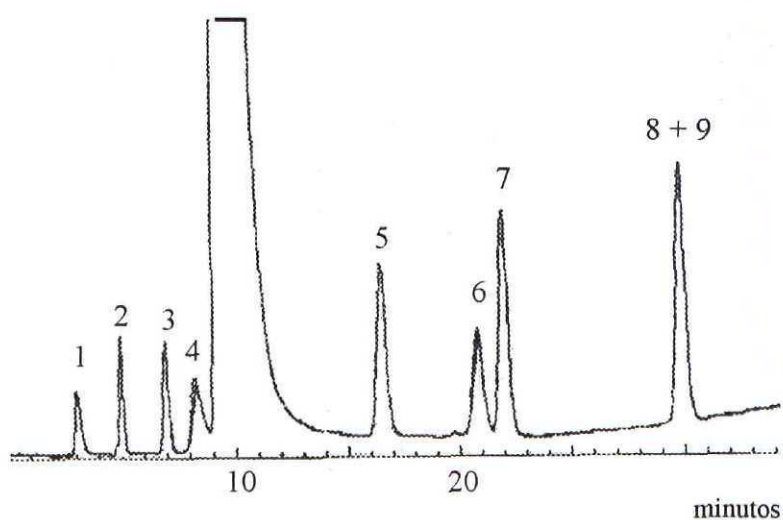


Figura 11. Cromatograma de la solución sintética a que se refiere la tabla 3, obtenido en las condiciones descritas en el apartado 2.2.1.1.

2.2.1.2 Análisis de los compuestos volátiles por DI-GC-FID, y empleo de una columna cromatográfica capilar.

2.2.1.2 a Preparación de la muestra

De igual forma que en el caso anterior, a de 10 mL de vino se le añadieron 50 μ L de patrón interno, (0,06 g de 3-pentanol preparado en una solución de etanol al 10 %). 1 μ L de esta solución se inyectó en modo split (1/15) en el cromatógrafo de gases.

2.2.1.2 b Equipo

Se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard M-5890 serie II, equipado con un detector de ionización de llama (FID), y con inyector split/splitless. La separación se llevó a cabo en una columna capilar Carbowax 20M de 30 m de longitud y 0,25 μ m de espesor de película de fase (Quadrex, Co., New Haven, C.T). El control del equipo, adquisición y procesado de datos, se llevó a cabo con el programa HP-Chem (HP 3365, serie II, Chemstation)

2.2.1.2 c Condiciones cromatográficas

La separación se llevó a cabo con una temperatura inicial del horno de 40 °C durante 10 minutos, aumentando 7 °C/min hasta 150 °C, y 30 °C / min hasta 210 °C, durante 2 minutos. Como gas portador se empleó Helio, con una presión de 12,5 psi. La temperatura del inyector y del detector fue de 220 °C.

2.2.1.2 d Identificación y análisis cuantitativo

La identificación de los distintos compuestos se basó en la comparación de los tiempos de retención relativos respecto al patrón interno, con los de los compuestos empleados como referencia (**Tabla 4**). La cuantificación se llevó a cabo por comparación del área relativa al patrón interno de cada compuesto con la obtenida en la

recta de calibrado correspondiente a cada sustancia patrón, en las mismas condiciones que la muestra problema.

Tabla 4. Tiempos de retención de los compuestos volátiles de la solución sintética preparada con fines de identificación, obtenidos del análisis por inyección directa con el empleo de una columna capilar.

Identificación	Compuesto	T _R (min)
1	Acetaldehído	3,50
2	Formiato de etilo	4,07
3	Acetato de etilo	4,63
4	Metanol	4,98
5	1-Propanol	8,65
6	Isobutanol	11,41
7	3-pentanol (patrón interno)	12,27
8	2-metil-1-butanol	16,48
9	3-metil-1-butanol	16,59
10	Lactato de etilo	20,39

En la **figura 12**, se muestra el cromatograma correspondiente a la solución de referencia descrita en la tabla 4, analizada con el empleo de la columna capilar y en las condiciones descritas en este apartado.

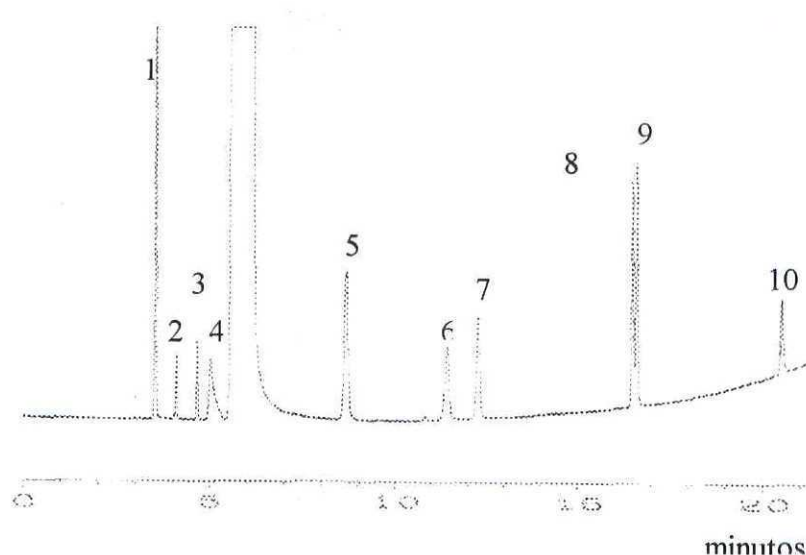


Figura 12. Cromatograma de la solución sintética a que se refiere la tabla 4, obtenido en las condiciones descritas en el apartado 2.2.1.2

2.2.2 Análisis de los compuestos volátiles de los vinos por microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME-GC).

El análisis de los compuestos volátiles que se encuentran en los vinos en concentraciones menores de 10 mg/L, requieren una etapa previa de extracción y concentración. Se ha empleado la técnica de HS-SPME, previo a su separación por cromatografía de gases. Para la identificación de los diferentes compuestos se han empleado dos tipos de detección, la ionización de llama (FID), que se ha empleado además para el análisis cuantitativo y la detección por espectrometría de masas (MS), que se ha utilizado sólo para el análisis cualitativo, es decir, con el fin de identificar todos los posibles compuestos volátiles que se encuentren en los vinos estudiados. Se han empleado diferentes condiciones cromatográficas, y equipos en cada uno de los dos procedimientos utilizados.

2.2.2.1 Análisis de los compuestos volátiles mediante el empleo de la microextracción en fase sólida del espacio de cabeza y detección por ionización de llama (HS-SPME-GC-FID).

2.2.2.1 a Preparación de la muestra

En la **figura 13**, se muestra el esquema del procedimiento seguido para la microextracción en fase sólida del espacio de cabeza de una muestra de vino. En un vial de muestra de 12 mL se introducen 5 mL de vino, 25 μ L de patrón interno (10 mg de nonanoato de metilo/100 mL de etanol), y 2 g de NaCl para favorecer el proceso de extracción. La muestra se dispone en un baño termostatzado a 40 °C con agitación magnética. La fibra de 10 mm de longitud recubierta con una fase de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μ m, (Supelco Inc., Bellefonte, P.A.), se introduce a través del septum del vial en el espacio de cabeza confinado entre la muestra y el tapón, y se mantiene en las condiciones señaladas durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, la fibra se lleva al “glass liner” del inyector en modo splitless, donde permanece 10 min para que tenga lugar la desorción de todos los compuestos extraídos. Los análisis se hicieron por duplicado.

2.2.2.1 b Equipo

Se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard, M-5890 serie II, con detector de ionización de llama (FID), e inyector split/splitless. La separación se llevó a cabo en una columna capilar Carbowax 20M de 30 m de longitud, 0,25 μ m de espesor de película de fase (Quadrex, Co., New Haven, CT). El control del equipo, adquisición y procesamiento de datos, se llevó a cabo con el programa HP-Chem (HP 3365, serie II, Chemstation)

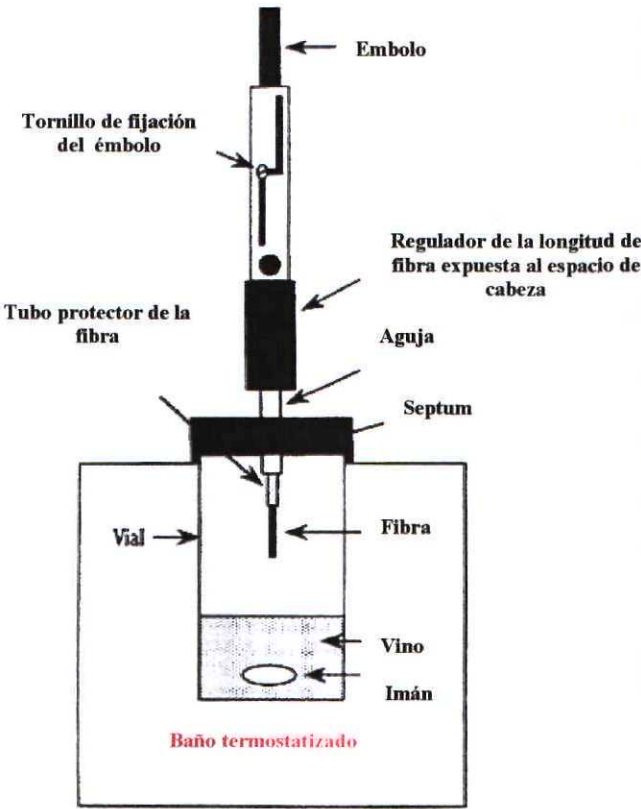


Figura 13. Análisis de compuestos volátiles de un vino mediante Microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME).

2.2.2.1 c Condiciones cromatográficas

La separación se realizó con una temperatura inicial del horno de 40 °C durante 10 min, aumentando 5 °C/min. hasta 200 °C, y 20 °C/min hasta 210 °C. Una vez alcanzada esta temperatura se mantiene durante 10 min. Se utilizó He como gas portador con una presión de 12,5 psi. La temperatura del inyector y del detector fue de 250 °C.

2.2.2.1 d Identificación y análisis cuantitativo.

La identificación de los distintos compuestos se basó en la comparación de los tiempos de retención relativos respecto al patrón interno, con los de los compuestos empleados como referencia (**Tabla 5**). La cuantificación se llevó a cabo por comparación del área relativa al patrón interno de cada compuesto con la obtenida en la recta de calibrado correspondiente a cada sustancia patrón, en las mismas condiciones que la muestra problema.

En la **figura 14**, se muestra el cromatograma correspondiente a la solución de referencia descrita en la tabla 5, analizada mediante el empleo de HS-SPME y en las condiciones descritas en este apartado.

Tabla 5. Compuestos volátiles de la solución sintética preparada con fines de identificación a través de los tiempos de retención y determinados por HS-SPME.

Identificación	Compuesto	T _R (min)
1	Acetato de isobutilo	8,05
2	Butanoato de etilo	8,86
3	Acetato de butilo	10,63
4	Acetato de isopentilo	13,09
5	Hexanoato de etilo	18,31
6	Acetato de hexilo	19,74
7	1-hexanol	22,85
8	Cis-3-hexen-1-ol	23,95
9	Octanoato de etilo	25,38
10	Nonanoato de metilo (patrón interno)	26,81
11	γ -butirolactona	27,35
12	Decanoato de etilo	31,22
13	Succinato de dietilo	32,48
14	Acido hexanoico	36,55
15	Acido octanoico	41,04
16	Acido decanoico	45,05

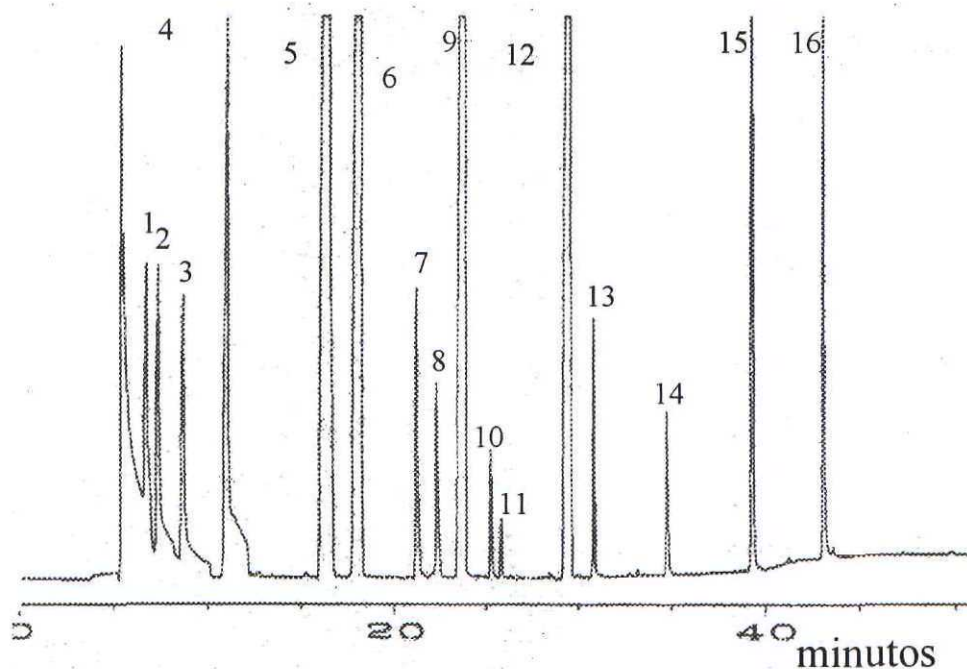


Figura14. Cromatograma de la solución sintética a que se refiere la tabla 5, obtenido en las condiciones descritas en el apartado 2.2.2.1

2.2.2.2 **Análisis de los compuestos volátiles mediante el empleo de microextracción en fase sólida del espacio de cabeza y detección por espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS).**

2.2.2.2 a **Preparación de la muestra**

La preparación de la muestra se llevó a cabo en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior.

2.2.2.2 b Equipo

Se utilizó un cromatógrafo de gases Fisons (Fisons Instrument, Milan, Italia), con inyector split/splitless, y equipado con un detector de ionización de llama (FID), y otro de espectrometría de masas de cuadrupolo, MD 800 (Fisons, VG MassLab, Manchester, UK). La ionización se llevó a cabo a 70 eV, en modo EI. Para la separación se empleó una columna capilar SupelcowaxTM-10 (Supelco Inc., Bellefonte, P.A.), de 50 m de longitud, 0,25mm de d.i., y 0,25 µm de espesor de película de fase. El control del equipo, adquisición y procesamiento de datos, se llevó a cabo con el programa MassLab v 1.4.

2.2.2.2 c Condiciones cromatográficas

La separación se realizó en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior. Se utilizó Helio como gas portador con un flujo de 0,8 mL/min.

2.2.2.2 d Identificación

La identificación se basó en la comparación de los espectros de masas de los distintos compuestos, con los de referencia recogidos en dos librerías de espectros de masas (NIST/WILEY Mass Spectral Database).

2.3 Análisis de compuestos fenólicos de bajo peso molecular

El análisis de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular se ha realizado por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) según el método descrito por Peña y col., (2000), y empleando dos tipos diferentes de detección, la detección por fotodiodos alineados (DAD), y por espectrometría de masas con ionización por electrospray (ESI-MS). Las condiciones de análisis y el equipamiento empleado en los dos tipos de procedimientos han sido diferentes, y se describen a continuación.

2.3.1 Análisis de compuestos fenólicos de bajo peso molecular mediante el empleo de RP-HPLC-DAD.

2.3.1.1 Preparación de la muestra.

50 mL de cada uno de los vinos se han extraído en embudo de decantación, tres veces con 25 mL de éter dietílico, y otras tres con 25 mL de acetato de etilo. A la fase orgánica así obtenida, se le eliminó el agua residual con sulfato sódico anhidro. La muestra una vez desecada se filtró por papel Whatman 40, y se concentró hasta sequedad en rotavapor a vacío a una temperatura no superior a 35 °C. El residuo se recogió con 2 mL de metanol/agua (1:1, v/v), y se filtró a través de un filtro de 0,45 µm (Millipore Corp., Milford, Ma) previamente a su análisis cromatográfico

2.3.1.2 Equipo

Se ha empleado como sistema cromatográfico, un cromatógrafo de líquidos Waters, compuesto por una bomba 600E, un inyector universal U6K, y un detector de fotodiodos alineados 991 (Waters. Milford, Ma, USA). Para la separación se ha empleado una columna de fase inversa Nova-Pack C18 de 60 Å (3,9 x 300 mm) y 4 µm de tamaño de partícula.

El control del equipo, adquisición y procesado de datos se ha realizado con el programa Waters 991.

2.3.1.3 Condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas son las que se describen a continuación:

□ **Eluyentes :**

Eluyente A: agua/ácido acético (98:2) (v/v).

Eluyente B: agua/acetonitrilo/ácido acético (78:20:2) (v/v/v).

□ **Gradiente:**

El programa de gradiente lineal empleado es el siguiente:

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0	1	100	0
55	1	20	80
57	1,2	10	90
70	1,2	10	90

2.3.1.4 Detección

Los cromatogramas se han registrado a 254, 280 y 340 nm. Los espectros se han obtenido por barrido desde 210 a 360 nm.

2.3.1.5 Identificación y análisis cuantitativo

La identificación se ha realizado por comparación de los tiempos de retención, y espectros de UV-Vis, con sustancias patrón analizadas en las mismas condiciones que las muestras de vinos.

La cuantificación se ha realizado con las rectas de calibrado calculadas para los diferentes compuestos patrón disponibles, en las condiciones previamente descritas. Las rectas de calibrado utilizadas se han obtenido a 280 nm, excepto para los ácidos cafeico,

p-cumárico y ferúlico que se han calculado a 340 nm, y para el p-hidroxibenzoico que se hizo a 254 nm.

2.3.2 Análisis de compuestos fenólicos de bajo peso molecular mediante el empleo de RP-HPLC-ESI-MS

2.3.2.1 Preparación de la muestra.

Se ha llevado en las mismas condiciones descritas en el apartado anterior.

2.3.2.2 Equipo

Se ha empleado un cromatógrafo de líquidos Hewlett Packard serie 1100 MSD, (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) con un detector de fotodiodos alineados Hewlett Packard serie 1100 y acoplado a un detector de espectrometría de masas de cuadrupolo simple equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI). Se utilizó nitrógeno como gas de nebulización y secante. Se han aplicado diferentes voltajes de fragmentación.

La separación se realizó con una columna de fase inversa Nova-Pack C₁₈ de 60 Å (3,9 x 150 mm), y 4 µm de tamaño de partícula.

Para el control del equipo, adquisición y procesado de datos se empleó el programa HP ChemStation (v. A.07).

2.3.2.3 Condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas empleadas son las que se describen a continuación:

□ Eluyentes

Eluyente A: agua/ácido acético (99:1) (v/v).

Eluyente B: acetonitrilo/ácido acético (99:1) (v/v)

□ Gradiente:

El programa de gradiente lineal empleado ha sido el siguiente:

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
0	0,5	100	0
60	0,5	20	80
70	0,5	0	100

2.3.2.4 Detección

La ionización de la muestra se ha llevado a cabo por electrospray (ESI) y se ha trabajado en modo negativo. Se ha empleado una presión de nebulización de 40 psi. La temperatura y flujo de gas de secado han sido 320 °C y 10L/min respectivamente. El voltaje del capilar fue de 4000V, y la fragmentación se llevó a cabo a distintos voltajes (50V, 80V y 200 V).

Los cromatogramas se han registrado a 254, 280, y 340 nm. Los espectros de UV-vis se han obtenido por barrido desde 210 a 360 nm.

2.4 Determinaciones convencionales

Con el término determinaciones convencionales se denomina a las que generalmente se realizan en las bodegas y que dan una idea global de la composición del vino. A continuación se relacionan las determinaciones realizadas a cada vino, así como el método por el que se llevaron a cabo.

2.4.1 pH

Se determinó con un pHmetro Orión Research, modelo 601-I.

2.4.2 Acidez volátil

Se determinó por valoración con NaOH 0,1N de los ácidos volátiles presentes en el vino previamente separados por arrastre de vapor. El resultado se expresa en g de ácido acético/L.

2.4.3 Acidez total

Determinación volumétrica con NaOH 0,1N hasta pH 7. El resultado se expresa en g ácido tartárico/L.

2.4.4 SO₂ total

Se utilizó el método de Paul (1958), basado en el arrastre por corriente de aire, en medio ácido, del anhídrido sulfuroso libre, a una disolución de agua oxigenada neutra, donde se oxida a ácido sulfúrico, el cual se valora con hidróxido sódico 0,01 N.

2.4.5 Polifenoles totales

Reacción de los polifenoles con los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico (reactivo de Folin-Ciocalteu), dando lugar a un producto coloreado que se cuantifica midiendo la absorbancia a 670 nm (Singleton y Rossi, 1965). Los resultados se expresan en g de ácido gálico/L

2.4.6 Ácido tartárico

Reacción colorimétrica con metavanadato amónico y lectura de la absorbancia a 500 nm en un espectrofotómetro Shimadzu, modelo UV-120-01, según el método descrito por Vidal y Blouin (1978).

2.4.7 Ácido L (-)-málico

Se ha llevado a cabo por reacción enzimática (Boehringer Mannheim S.A., 1975). Se ha utilizado la enzima L-(-)-malato deshidrogenasa como catalizador de la reacción entre el ácido L-(-)-málico y NAD^+ , formándose oxalacetato y NADH. El incremento de NADH formado que es proporcional a la cantidad de ácido L-(-)-málico de la muestra, se mide espectrofotométricamente a 340 nm.

2.4.8 Ácido L (+)- láctico

Se ha llevado a cabo por reacción enzimática (Boehringer Mannheim S.A., 1975). Se ha utilizado la enzima L-(+)-lactato deshidrogenasa como catalizador de la reacción entre el ácido L-(+)-láctico y el NAD^+ , formándose ácido pirúvico y NADH. El incremento de NADH formado que es proporcional a la cantidad de ácido L-(+)-láctico de la muestra, se mide espectrofotométricamente a 340 nm.

2.4.9 Azúcares reductores

Oxidación de los azúcares por el cobre divalente en medio alcalino y en caliente (a ebullición). Se evita la insolubilización del cobre en medio alcalino complejándolo. La determinación se llevó a cabo según el método de la O.I.V. (1993).

2.4.10 Grado alcohólico

Se determinó mediante el método aerométrico, que consiste en la destilación del vino y medida del grado alcohólico del destilado, con un alcoholómetro, a 20 °C.

2.4.11 Nitrógeno total

Se determinó por el método Kjeldahl con un sistema de digestión Tecator y un analizador Kjeltex Auto 1030. El procedimiento del análisis es el siguiente: digestión por ataque con ácido sulfúrico concentrado a ebullición, en presencia de un catalizador (sulfato potásico y sulfato de cobre) y un antiespumante (agua oxigenada) y destilación

en medio alcalino, recogién dose el destilado sobre una solución de ácido bórico con indicador de rojo de metilo y verde de bromocresol. El amoníaco recogido se valora posteriormente con ácido clorhídrico 0,1 N.

2.4.12 Determinación de proteínas

Se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976), basado en la reacción de las proteínas con el Azul Brillante de Coomassie G-250 y lectura de la absorbancia a 595 nm, después de 15 minutos de la adición del reactivo. Los resultados se expresaron en mg de seroalbúmina bovina (BSA)/L.

2.4.13 Determinación de aminoácidos libres. Método colorimétrico

Los aminoácidos libres se determinaron por el método de la ninhidrina-cadmio (Doi y col., 1981). Los resultados se expresaron en mg de leucina/L.

2.5 Análisis de compuestos antociánicos.

El análisis de los compuestos antociánicos se ha realizado por cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) según el método descrito por González-Sanjosé (1988) con algunas modificaciones, y empleando la detección por fotodiodos alineados (DAD). Las condiciones de análisis son las que a continuación se describen.

2.5.1 Preparación de la muestra

15 mL de cada uno de los vinos se han liofilizado hasta sequedad y reconstituído a un volumen final de 1mL con una solución de etanol 10%. Previo al análisis, las muestras se filtraron a través de un filtro de 0,45 μ m (Millipore Corp., Milford, Ma.)

2.5.2 Equipo

Se ha empleado como sistema cromatográfico, un cromatógrafo de líquidos Waters, formado por una bomba 600-MS, un inyector automático 717 Plus y un detector de fotodiodos alineados 996 (Waters, Milford, Ma, USA). La separación se ha realizado

en columna de fase inversa Nova-Pack C₁₈ de 60Å (3,9 x 150 mm) de 4 µm de tamaño de partícula, protegida por una precolumna del mismo material.

El control del equipo, adquisición y procesado de datos se ha realizado con el programa Millennium (v. 2.1), (Waters, Milford, Ma, USA).

2.5.3 Condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas empleadas son las siguientes:

□ Eluyentes

Eluyente A: agua/ácido fórmico (90:10) (v/v).

Eluyente B: agua/metanol/ácido fórmico (45:45:10) (v/v/v).

Eluyente C: metanol/agua (45:55) (v/v).

□ Gradiente

El programa de gradiente empleado es el que recoge en la tabla 6.

2.5.4 Detección

Se ha empleado un detector de fotodiodos alineados Waters 996. Se ha realizado el barrido espectral entre 200 y 600 nm tomando medidas cada 2 nm. Los cromatogramas se registraron a 530 nm.

Tabla 6. Programa de gradiente empleado para la separación de los antocianos.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)	Eluyente C (%)
0	0,8	85	15	0
30	0,8	20	80	0
43	0,8	20	80	0
48	0,8	0	0	100
52	0,8	0	0	100
55	0,8	85	15	0

2.5.5 Identificación y análisis cuantitativo

La identificación se ha basado en la comparación de los tiempos de retención y de los espectros de UV, con compuestos patrón analizados en las mismas condiciones que las muestras de vinos, o con datos bibliográficos, cuando esto no ha sido posible.

La cuantificación se ha realizado, con la recta de calibrado del malvidín-3-glucósido, que es el antociano mas abundante en los vinos, calculada en las condiciones previamente descritas.

2.6 Determinación de los parámetros de color

2.6.1 Equipo

Se ha empleado un espectrofotómetro DU^R-70 Beckman (Fullerton, USA), y se ha medido la absorbancia a tres longitudes de onda, 420, 520, y 620 nm.

2.6.2 Intensidad de color

Se ha determinado por la suma de las Absorbancias a 420 y 520 nm:

$$I = A_{420} + A_{520}$$

2.6.3 Tonalidad

Se ha calculado como la relación entre las Absorbancias a 420 y 520 nm:

$$T = A_{420}/A_{520}$$

2.6.4 Porcentajes de rojo, amarillo y azul

Se han calculado siguiendo el método descrito por Glories (1984). El porcentaje de cada color se ha obtenido de las siguientes relaciones:

$$\% \text{ de amarillo} = (A_{420}/X) 100$$

$$\% \text{ de rojo} = (A_{520}/X) 100$$

$$\% \text{ de azul} = (A_{620}/X) 100$$

$$\text{Donde } X = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

2.7 Estudio de las propiedades espumantes de los vinos

Para el estudio de las propiedades espumantes de los vinos, se han seguido la metodología descrita por Moreno-Arribas y col. (2000), empleando un equipo diseñado en el Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC).

2.7.1 Determinación de las propiedades espumantes mediante el empleo de un equipo con detector de ultrasonidos y guía de ondas.

Un esquema del equipo se puede observar en la **figura 15**. El método se basa en la medida del incremento de altura de un líquido dispuesto en un tubo de vidrio termostatzado (1) cuando se hace pasar aire a través de una placa fritada ubicada en la parte inferior del mismo. La altura del líquido es detectada a través de un transmisor-receptor de ondas de ultrasonido (Baumer Electric Mod. Unam 3019103 (4), alimentado por una fuente de 24 V (6), en cuyo extremo inferior se encuentra una guía de ondas de ultrasonido (5). Un regulador de flujo (Hitec, Mod. F201c-Fa) (8) regula la presión de aire a través de una válvula (10).

Las condiciones experimentales que se siguieron fueron las siguientes: 25 mL de vino desgasificado en el tubo, temperatura de 20 ° C, flujo de aire 125 mL/min, y tiempo de análisis de 1000 s. Los datos fueron recogidos y procesados por un programa original que permite almacenar los datos para el análisis posterior. Entre medida y medida, el tubo de vidrio se lavó sucesivamente con agua Milli-Q (Millipore Corp.,

Milford, Ma.) y con la muestra que iba a ser analizada, haciéndose pasar posteriormente aire a través del fritado.

En la **figura 16**, se puede observar a modo de ejemplo, el perfil característico de los diagramas de gasificación, en los que se representa la evolución de la espuma en función del tiempo para uno de los vinos estudiados. Los parámetros determinados fueron: *Hpico* (altura del pico o máximo valor alcanzado por la espuma), *Hplató* (altura de plató de espuma o altura a la que la espuma se estabiliza), y *Sd300* (desviación estándar de la espuma en los últimos 300 puntos antes de cerrar el paso del aire).

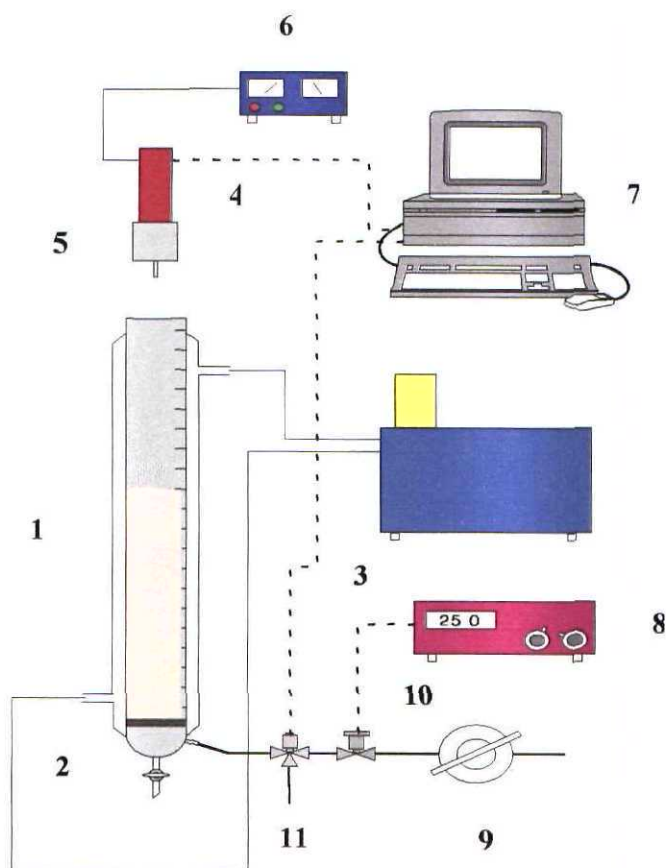


Figura 15. Esquema del equipo de medida de espuma mediante un detector de ultrasonidos y una guía de ondas. 1: tubo de vidrio; 2: camisa de termostatización; 3: baño termostático; 4: emisor/receptor de ultrasonidos; 5: guía de ondas; 6: fuente de voltaje; 7: sistema de adquisición de datos; 8: control de flujo de gas; 9: manoreductor; 10: válvula de regulación; 11: válvula d entrada de gas.

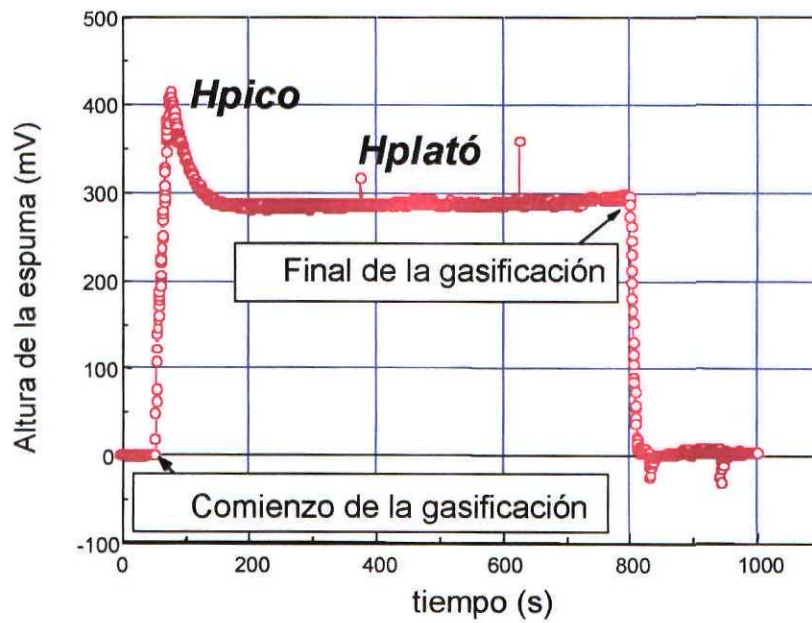


Figura 16. Perfil de la espuma de uno de los vinos estudiados, obtenido mediante el sistema de medida de espuma con detector de ultrasonidos y guía de ondas.

2.8 Análisis sensorial

2.8.1 Análisis sensorial global de los cavas

Se utilizó la ficha de la Subdirección General de Denominaciones de Calidad del MAPA (antiguo Instituto Nacional de Determinaciones de Origen, INDO). Se trata de una ficha penalizadora, de forma que a menor puntuación corresponde una calidad mayor del vino. En la **figura 17**, se muestra la ficha utilizada con los parámetros que se evalúan. Se observan 4 fases principales: fase visual, fase olfativa, fase gustativa y armonía. Cada una de ellas incluye 6 tramos, de excelente a defectuoso que se puntúan de forma diferente, la fase visual hasta 8 puntos, la intensidad olfativa, la calidad olfativa y la intensidad gustativa hasta 18, la calidad gustativa, y la armonía hasta 27. Hay un último calificativo para cada atributo que es “eliminado”.

La evaluación se llevó a cabo por un panel de expertos formado por 10 catadores, en la Escuela de la Vid e Industrias Lácteas de la Comunidad de Madrid.

- ❑ **Fase visual:** en esta fase se evalúan fundamentalmente aspectos como la limpidez, intensidad de color y tonalidad, fluidez y efervescencia.
- ❑ **Fase olfativa:** son las sensaciones que se pueden percibir por vía nasal directa o vía buconasal.
- ❑ **Fase gustativa:** son las sensaciones relacionadas con el sabor, que es una percepción combinada de los sentidos del gusto y del olfato.
- ❑ **Armonía:** Se refiere a la interacción entre los cuatro sabores que pueden encontrarse en el vino, sin que se produzcan interferencias que ocultan, exaltan o modifican los sabores fundamentales.

Se calculó el valor medio y la desviación estándar de la puntuación global de cada vino. En el análisis de cada uno de los vinos, se eliminaron los catadores que puntuaron con una desviación estándar de la media mayor o menor de 15, y se volvió a calcular una nueva media sin incluir sus calificaciones.

INSTITUTO NACIONAL DE DENOMINACION DE ORIGEN
COMITE DE CATA

NUMERO DE MUESTRA _____
DENOMINACION DE ORIGEN _____
COMARCA VITIVINICOLA _____

BOGOSA _____
MARCA _____
Clase de vino _____
Tipo de vino _____
Añada _____

Fecha _____
Cataador _____

		Excelente	Muy bien	Bien	Correcto	Rapido	Delectuoso	Eximado	Portuquien	OBSERVACIONES
Pase visual	Intensidad	0	1	2	4	5	6	7	8	
	Pase olfativo	0	2	3	5	12	15	16	17	
Pase gustativa	Calidad	0	2	3	5	12	15	16	17	
	Intensidad	0	2	3	5	12	15	16	17	
Armonia	Calidad	0	2	3	5	12	15	16	17	
	Intensidad	0	2	3	5	12	15	16	17	

Excelente: 0 - 7
Muy bien: 8 - 23
Bien: 24 - 44
Correcto: 45 - 62
Rapido: 63 - 78
Delectuoso: 79 - 90
Eximado: 91 - 99

FIRMA _____

Figura17. Ficha de cata de la Subdirección General de Denominaciones de Calidad del MAPA, utilizada en el análisis sensorila global de los vinos espumosos.

2.3.8 Métodos estadísticos

Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizaron las técnicas de análisis de la varianza (ANOVA), análisis de componentes principales, análisis de correlación canónica, análisis de regresión lineal y análisis de conglomerados. Los datos se procesaron a través del programa Statistica (Statsoft, Inc. 1996). El programa se ejecutó en un ordenador personal PC-Pentium II.

3-Resultados y Discusión

3.1 Identificación de los compuestos volátiles minoritarios por espectrometría de masas

Los compuestos volátiles minoritarios del vino se han analizado por microextracción en fase sólida del espacio de cabeza seguida de su inyección en cromatografía de gases y separación en una columna capilar en las condiciones descritas en el apartado 2.2.2.2 de Material y Métodos. En la **tabla 7** se muestra la relación de los compuestos volátiles minoritarios identificados en los vinos así como los tipos de vino en los que se han detectado. Se indica también el tipo de detector con el que han sido detectados o identificados, el detector de ionización de llama (FID) o el espectrómetro de masas (MS). Como se puede comprobar, se han identificado un total de 22 compuestos. Aunque hay algunas excepciones, la mayoría de ellos están presentes en todos los vinos. El acetato de isobutilo y el acetato de butilo no se han detectado en ninguno de los vinos. Estos compuestos han sido detectados en otros vinos en concentraciones menores de 0,55 mg/L (Versini y col., 1982; Silva y col., 1987; Mazzoleni y col., 1993; etc). El 5-metil-2-heptanol solo se ha detectado en los vinos de la variedad Trepát, el acetato de 2-fenil etanol no se ha detectado en los vinos de la variedad Monastrell y el cis-3-hexen-1-ol no se ha detectado en los vinos de mezcla ni en los vinos de la variedad Garnacha.

Tabla 7. Compuestos volátiles minoritarios identificados en los vinos analizados por microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SMPE-GC). Se indica también si se disponía de patrones, si se han detectado por FID y/o MS y los vinos en los que se han detectado.

Nº	COMPUESTO	Detector			Vinos (variedad)					
		Patr	FID	MS	Mez	Par	Tip	Trep	Mon	Gar.
1	Acetato de isobutilo	*	*	*						
2	Butanoato de etilo	*	*	*	*	*	*	*	*	*
3	Acetato de butilo	*	*	*						
4	Acetatode isopentilo	*	*	*	*	*	*	*	*	*
5	Hexanoato de etilo	*	*	*	*	*	*	*	*	*
6	Acetato de hexilo	*	*	*	*	*	*	*	*	*
7	1-hexanol	*	*	*	*	*	*	*	*	*
8	cis-3-hexen-1-ol	*	*	*		*		*	*	
9	5-metil-2-heptanol		*	*				*		
10	Octanoato de metilo		*	*	*	*	*	*	*	*
11	Octanoato de etilo	*	*	*	*	*	*	*	*	*
12	γ-butirolactona	*	*							
13	Decanoato de etilo	*	*	*	*	*	*	*	*	*
14	9-decenoato de etilo		*	*	*	*		*	*	*
15	Succinato de dietilo	*	*	*	*	*	*	*	*	*
16	Acetato de 2-feniletanol		*	*	*	*	*	*	*	*
17	Ácido hexanoico	*	*	*	*	*	*	*	*	*
18	2-fenil-etanol	*	*	*	*	*	*	*	*	*
19	Tetradecanoato demetilo		*	*	*	*	*	*	*	*
20	Ácido octanoico	*	*	*	*	*	*	*	*	*
21	Hexadecanoatode metilo		*	*	*	*	*	*	*	*
22	Ácido decanoico	*	*	*	*	*	*	*	*	*

Mez: Vino base y espumosos elaborados con mezclas de variedades blancas Xarel.lo, Macabeo y Parellada, descritos en el apartado 2.1.1

Par.: Vinos espumosos elaborados con la variedad Parellada, descritos en el apartado 2.2.1

Tipus: Vino base y espumosos elaborados con mezclas de variedades blancas, Macabeo, Xarel.lo y Parellada, descritos en el apartado 2.4.1

Trepap: Vinos base y espumosos elaborados con la variedad Trepap, decritos en el apartado 2.3.1.

Mon.: Vinos base y espumosos elaborados con la variedad Monastrell, descritos en el apartado 2.3.1.

Gar.: Vinos base y espumosos elaborados con la variedad Garnacha, descritos en el apartado 2.3.1.

La detección por acoplamiento de la cromatografía de gases a la espectrometría de masas (GC/MS), ha permitido confirmar la identidad de todos los compuestos detectados con el detector de ionización de llama, con excepción de la γ -butirolactona. Las lactonas tienen la fórmula general que se muestra en la **figura 18**, en las que R es un grupo alquilo. Al analizarlas por espectrometría de masas, el pico más importante se produce por rotura adyacente al oxígeno para dar un fragmento de m/z 85 en el caso de las γ -lactonas. El hecho de no haber detectado la γ -butirolactona con el espectrómetro de masas, podría ser debido a que las condiciones de ionización utilizadas no son las más adecuadas para la fragmentación de este compuesto.

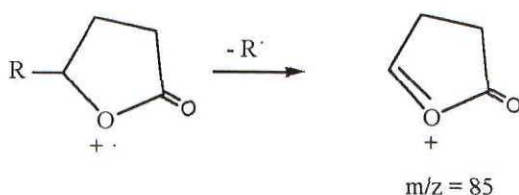


Figura 18. Reacción de las γ -lactonas para dar el fragmento m/z 85

Uno de los compuestos cuya presencia no es muy frecuente o al menos no ha sido reportada por muchos autores y que se ha identificado en estos vinos, es el 9-decenoato de etilo. El espectro de masas y su fórmula química, se muestra en la figura 5. Este compuesto ha sido detectado en vinos blancos de la variedad Riesling por Simpson (1978) y por Rapp y col. (1985). Nosotros lo hemos encontrado también en los vinos de las variedades tintas. Según Mihara y col. (1987) es uno de los compuestos que tienen mayor influencia en el aroma del membrillo.

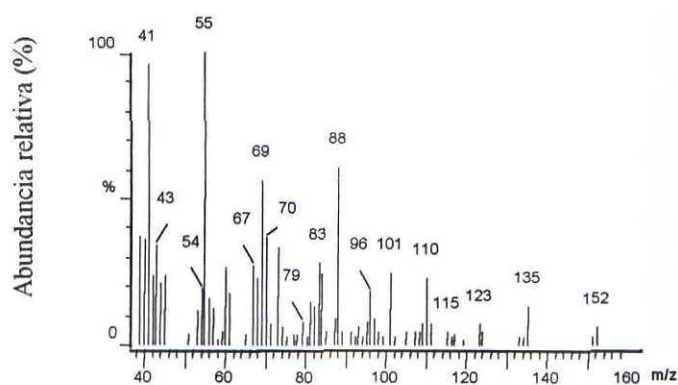


Figura 19. Espectro de masas del 9-decanoato de etilo

También ha sido detectada la presencia de varios ésteres metílicos, como el octanoato de metilo, y dos ésteres metílicos de elevado peso molecular, el tetradecanoato de metilo (o miristato de metilo), y el hexadecanoato de metilo (o palmitato de metilo). El tetradecanoato de metilo, ha sido también determinado en vinos por Noble (1980). La identificación de estos compuestos se ha realizado porque es característico el fragmento m/z 74, que se produce como consecuencia de la transposición de McLafferty, que se da con frecuencia en los ésteres metílicos, y en los etílicos, aunque en este último caso dando lugar al fragmento de m/z 88. **En la figura 20** se muestra el espectro de masas del uno de los ésteres metílicos determinados en los vinos estudiados y el proceso de transposición de McLafferty para dar lugar ion de m/z 74, característico de estos compuestos.

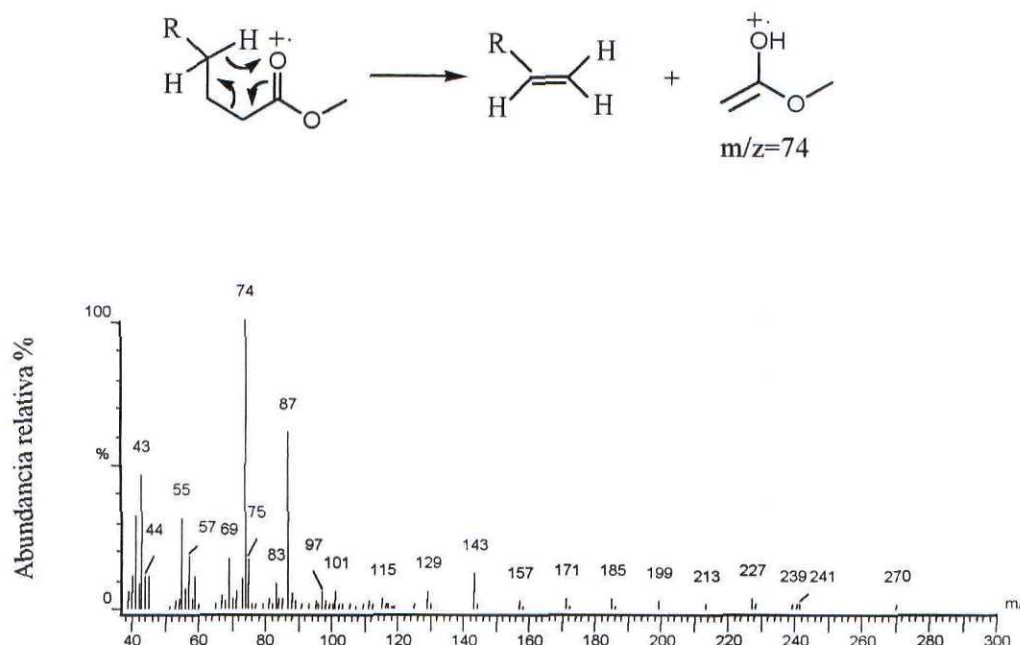


Figura 20. Transposición de McLafferty y espectro de masas del 9-decenoato de etilo

3.2 Validación del método de HS-SPME empleado para el análisis de compuestos volátiles minoritarios.

El análisis de los compuestos mayoritarios en los vinos por inyección directa es una técnica muy extendida y contrastada. No ocurre lo mismo, con el análisis de los compuestos volátiles minoritarios de los vinos por HS-SPME. Hasta el momento, los diversos estudios que hay, están basados principalmente en el análisis de las condiciones de extracción y desorción de otro tipo de compuestos y en otras matrices. Por tanto, es importante estudiar la validez del método de análisis propuesto. Para ello en este apartado, se ha estudiado, el efecto de la matriz en la extracción de los compuestos volátiles al espacio de cabeza, la precisión del método, los límites de detección para cada compuesto, la linealidad y la recuperación.



Según algunos autores (Yang y col., 1994; de la Calle, 1996; Prosen, 1999; Abdel-Rehim, 2000), la adsorción de los distintos analitos a la fibra de SPME se ve favorecida por el aumento de la fuerza iónica del medio. Es por esto, que en los análisis de los compuestos volátiles con esta técnica, tanto a las soluciones de calibrado como a los vinos, se les ha añadido 2 g de NaCl, por cada 5 mL de muestra, es decir, una concentración de saturación, para así favorecer la liberación de los compuestos volátiles al espacio de cabeza.

El tiempo necesario para la completa desorción de todos los analitos retenidos en la fibra, se ha evaluado realizando inyecciones en blanco, con la fibra localizada en el inyector, una vez que se ha producido la inyección de la muestra. Se ha comprobado que no se detecte ninguna impureza, y que la fibra esté completamente limpia. Se ha estimado que el tiempo necesario para la completa desorción de una muestra es de al menos 10 minutos.

La composición del espacio de cabeza del vial en el que la muestra está depositada, depende de las proporciones relativas de los diferentes compuestos volátiles que van a ser determinados. Por eso, es necesario comprobar la influencia del etanol, en la adsorción de los diferentes compuestos a la fibra. La **figura 21**, muestra las relaciones de las áreas relativas al patrón interno, frente a la concentración de dos de los compuestos analizados, un éster, el acetato de butilo, y un alcohol, el 1-hexanol. Como puede observarse en la figura, el área relativa de cada uno de estos dos compuestos, es mayor cuando están disueltos en agua (símbolos llenos), que cuando están disueltos en una solución con 10 % de etanol (símbolos huecos). Por tanto, las soluciones de calibrado fueron preparadas en etanol 10 %, que es la concentración habitual de los vinos.

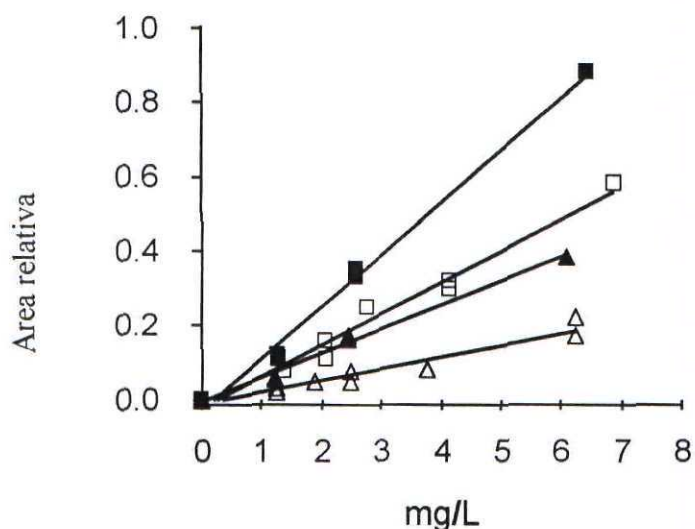


Figura 21. Representación del área relativa respecto a la concentración de acetato de butilo disuelto en agua (■); acetato de butilo disuelto en 10% de etanol (□); 1-hexanol disuelto en agua (▲); 1-hexanol disuelto en 10 % de etanol (△).

Para evaluar la calidad del método de HS-SPME empleado en el análisis de compuestos volátiles minoritarios, se consideraron una serie de parámetros representativos de la calidad analítica, que fueron la precisión, el límite de detección, el intervalo de linealidad, y la recuperación. Los resultados se muestran en las tablas 5 y 6.

3.2.1 Repetibilidad

La precisión es la dispersión de los distintos valores obtenidos al realizar una serie de medidas repetitivas e independientes unas de otras con el mismo método, bajo unas condiciones específicas. Cuantifica la variabilidad de los resultados analíticos en función del operador, las manipulaciones inherentes al método y el medio ambiente del laboratorio entre otros.

Las medidas de precisión son clasificadas en términos de posibles fuentes de variabilidad: replicabilidad, repetibilidad y reproducibilidad. La repetibilidad se acepta como una medida de la dispersión interna (una misma muestra analizada en el mismo

laboratorio con el mismo equipamiento y con el mismo operador en un intervalo corto de tiempo). Mide los denominados errores que son inevitables y se reflejan en las fluctuaciones que son impredecibles que se presentan en el uso del método. Es indicativo de la precisión máxima que se puede obtener con un cierto método.

Para evaluar la precisión del método analítico empleado, se determinó su repetibilidad, mediante el análisis del espacio de cabeza de 5 mL de una solución de patrones en etanol al 10 % de los distintos compuestos volátiles estudiados. El análisis se realizó 4 veces en el mismo día y en las mismas condiciones que se detallan en el apartado 2.2.2. La precisión del método se expresó como la desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de variación (CV).

En la **tabla 8** se muestra las desviaciones estándar relativas, o coeficientes de variación, que están comprendidos entre el 1,38 y 12,83 % siendo menores del 10 % en 11 de los 15 compuestos estudiados. El valor mayor corresponde al acetato de butilo, y el menor a la γ -butirolactona. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Vas y col. (1998), que utilizando esta técnica encontraron para los 22 compuestos volátiles responsables del aroma del vino, coeficientes de variación comprendidos entre 1 y 15 %.

3.2.2 Límite de detección

El límite de detección se calculó siguiendo los criterios de la IUPAC, como tres veces la señal correspondiente al ruido del sistema. Para determinar la señal producida por el ruido del sistema, se realizaron siete análisis en blanco y se calculó la media correspondiente al área del ruido. El límite de detección se calculó para cada uno de los compuestos analizados, teniendo en cuenta las ecuaciones obtenidas del análisis de regresión.

Los límites de detección, se muestran en la **tabla 8**. Se encuentran comprendidos entre 0,002 mg/L para el decanoato de etilo, y 1,390 mg/L, para la γ -butirolactona. Los valores más bajos corresponden a los ésteres, entre 0,002 y 0,084 mg/L, a continuación los alcoholes, con límites de detección entre 0,152 y 0,490 mg/L, y los ácidos, entre 0,091 y 0,577 mg/L.

Tabla 8. Repetibilidad y límite de detección del método de Microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME), empleado para el análisis de compuestos volátiles minoritarios en vinos.

Compuestos	Repetibilidad RSD (%)	Límite de detección (mg/L)
Esteres		
Acetato de isobutilo	7,63	0,049
Butanoato de etilo	6,14	0,033
Acetato de butilo	12,83	0,055
Acetato de isopentilo	9,89	0,017
Hexanoato de etilo	11,39	0,007
Acetato de hexilo	12,71	0,006
Octanoato de etilo	4,53	0,003
Decanoato de etilo	2,33	0,002
Succinato de dietilo	6,36	0,084
Alcoholes		
1-hexanol	8,73	0,152
cis-3-hexen-1-ol	10,41	0,490
Ácidos grasos		
Ácido hexanoico	3,14	0,577
Ácido octanoico	6,73	0,095
Ácido decanoico	7,39	0,091
Otros compuestos		
γ -butirolactona	1,38	1,39

3.2.3 Linealidad

La linealidad de un método se define como la capacidad de mantener invariable la función de calibrado para el intervalo de concentraciones de trabajo.

El intervalo de linealidad se calculó para cada compuesto patrón en el rango de concentraciones descrito en la **tabla 9**. Se hicieron curvas de calibrado con 5 puntos cada una, con dos réplicas de la solución estándar. Para comprobar si la correlación entre la concentración de la sustancia patrón estudiada y el área relativa al patrón interno, se ajustaba a una función polinómica de primer orden, se llevó a cabo un test de falta de ajuste (F-ratio for lack of fit). Cuando el resultado de la aplicación de este test fue significativo, y por tanto no se trataba de una regresión lineal, se llevó a cabo el ajuste a un polinomio de segundo grado. En la **tabla 9**, se muestran los distintos

coeficientes (a , b , y c) obtenidos de la aplicación del análisis de regresión. Se muestran además los valores correspondientes a los coeficientes de determinación (R^2). Los R^2 , fueron mayores de 0,900 en todos los casos, indicando que el ajuste era aceptable. En esta tabla se muestran a su vez los intervalos de confianza al 95% para la pendiente, en el caso de los compuestos que presentaban un ajuste lineal.

3.2.4 Recuperación

Para evaluar la recuperación del método de extracción empleado, se añadieron a un vino cinco concentraciones diferentes de la solución de patrones en el rango indicado en la **tabla 10**. El análisis de los vinos añadidos con las cinco concentraciones diferentes se llevó a cabo por duplicado. La recuperación se calculó empleando la siguiente expresión:

$$R = \frac{\text{Cantidad del compuesto A en el vino tras la adición} - \text{Cantidad del compuesto A en el vino sin la adición}}{\text{cantidad del compuesto A añadida}} \times 100$$

En la **tabla 10**, se muestran los valores de recuperación obtenidos tras hacer la media correspondiente a todos puntos del intervalo de concentraciones estudiadas, y teniendo en cuenta los valores correspondientes a la recuperación en otras dos muestras de vino diferentes, realizadas en las mismas condiciones. Los valores medios de recuperación obtenidos están entre el 87 % para el acetato de hexilo, y 120 % para el succinato de dietilo. La media de recuperación para todos los compuestos estudiados fue de 97 %.

Para evaluar los posibles errores sistemáticos causados por el hecho de que la recta de calibrado obtenida con la solución de patrones en etanol 10 %, no tuviera la misma pendiente que las funciones calculadas en las muestras añadidas, lo que querría decir que hay un efecto matriz, se comprobó que las pendientes calculadas para todos los compuestos en las muestras añadidas, estuvieran dentro del intervalo de confianza al 95 % calculado para la pendiente y que se muestra en la **tabla 9**. Como se recoge en la **tabla 10**, en la mayoría de los compuestos estudiados no se encontraron diferencias significativas entre las pendientes calculadas en los vinos añadidos, y con la solución

de patrones. Únicamente para el acetato de butilo, acetato de isopentilo, y ácido octanoico, se encontraron diferencias significativas.

Tabla 9. Regresión polinómica ($y = ax^2 + bx + c$) del área relativa frente a la concentración en la solución de calibrado.

Compuestos	Rango (mg/L)	a	b	c	R ²	Número de puntos	IC
Esteres							
Acetato de isobutilo	0-7.5	0.0032	0.0467	-0.0081	0.967	10	-----
Butanoato de etilo	0-6.9	0.0037	0.0513	-0.0054	0.958	10	-----
Acetato de butilo	0-6.9	ns	0.0842	-0.0214	0.979	10	0.074-0.094
Acetato de isopentilo	0-5.8	ns	0.2692	-0.0329	0.992	10	0.250-0.288
Hexanoato de etilo	0-13.2	ns	0.7163	0.1818	0.959	10	0.595-0.837
Acetato de hexilo	0-8.2	ns	0.7403	0.1467	0.963	10	0.621-0.859
Octanoato de etilo	0-13.4	ns	2.6742	-0.3174	0.993	10	2.493-2.855
Decanoato de etilo	0-8.7	ns	2.3123	1.4499	0.938	9	1.783-2.842
Succinato de dietilo	0-10.7	ns	0.0121	-0.0083	0.900	10	0.009-0.015
Alcoholes							
1-hexanol	0-3.8	ns	0.0219	0.0021	0.926	9	0.016-0.027
Cis-3-hexen-1-ol	0-15.1	ns	0.0072	0.0015	0.945	9	0.006-0.009
Ácidos grasos							
Ácido hexanoico	0-18.0	ns	0.0047	0.0006	0.936	10	0.004-0.006
Ácido octanoico	0-5.3	ns	0.0300	0.0053	0.934	10	0.023-0.036
Ácido decanoico	0-3.2	0.0377	0.0034	0.0152	0.966	10	-----
Otros compuestos							
γ-butirolactona	0-65.8	ns	0.0060	-0.0022	0.961	10	0.005-0.007

R², coeficiente de determinación;

IC, 95% intervalo de confianza para la pendiente en un modelo de primer ordenconfidence interval for the slope of first-order model;

ns, no significativamente diferente de cero ($p > 0.05$).

Tabla 10. Regresión polinómica ($y = ax^2 + bx + c$) del área relativa frente a la concentración en la solución de calibrado.

Compuestos	Rango (mg/L)	a	b	c	R ²	Número de puntos	IC
Esteres							
Acetato de isobutilo	0-7.5	0.0032	0.0467	-0.0081	0.967	10	-----
Butanoato de etilo	0-6.9	0.0037	0.0513	-0.0054	0.958	10	-----
Acetato de butilo	0-6.9	ns	0.0842	-0.0214	0.979	10	0.074-0.094
Acetato de isopentilo	0-5.8	ns	0.2692	-0.0329	0.992	10	0.250-0.288
Hexanoato de etilo	0-13.2	ns	0.7163	0.1818	0.959	10	0.595-0.837
Acetato de hexilo	0-8.2	ns	0.7403	0.1467	0.963	10	0.621-0.859
Octanoato de etilo	0-13.4	ns	2.6742	-0.3174	0.993	10	2.493-2.855
Decanoato de etilo	0-8.7	ns	2.3123	1.4499	0.938	9	1.783-2.842
Succinato de dietilo	0-10.7	ns	0.0121	-0.0083	0.900	10	0.009-0.015
Alcoholes							
1-hexanol	0-3.8	ns	0.0219	0.0021	0.926	9	0.016-0.027
Cis-3-hexen-1-ol	0-15.1	ns	0.0072	0.0015	0.945	9	0.006-0.009
Ácidos grasos							
Ácido hexanoico	0-18.0	ns	0.0047	0.0006	0.936	10	0.004-0.006
Ácido octanoico	0-5.3	ns	0.0300	0.0053	0.934	10	0.023-0.036
Ácido decanoico	0-3.2	0.0377	0.0034	0.0152	0.966	10	-----
Otros compuestos							
γ-butirolactona	0-65.8	ns	0.0060	-0.0022	0.961	10	0.005-0.007

R², coeficiente de determinación;

IC, 95% intervalo de confianza para la pendiente en un modelo de primer ordenconfidence interval for the slope of first-order model;

ns, no significativamente diferente de cero ($p > 0.05$).

3.3. Identificación de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular mediante el empleo de cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) con un detector de fotodiodos alineados y por acoplamiento con un detector de espectrometría de masas.

Todos los compuestos fenólicos determinados en esta Memoria se han analizado por HPLC en fase inversa, con detección por fotodiodos alineados (DAD) lo que ha permitido obtener los espectros UV-VIS de todos los picos detectados. Para confirmar la identidad de algunos compuestos, e intentar elucidar la estructura de otros que aparecen en los cromatogramas de los vinos analizados, y que no fué posible identificarlos por sus características espectrales o su identificación era dudosa, se llevó a cabo el análisis de los mismos vinos por HPLC en fase inversa, con un sistema de detección doble, detección UV-VIS con fotodiodos alineados y por espectrometría de masas con ionización por electrospray. Las condiciones de análisis se describen en el apartado 2.3.2. Este tipo de ionización permite la formación del ión molecular, evitándose o al menos minimizándose la fragmentación del analito, por lo que resulta una valiosa herramienta para el análisis cualitativo. Se ha llevado a cabo la ionización en modo negativo, por lo que el ión molecular que se produce, tiene una relación masa/carga o m/z , correspondiente al peso molecular de ese compuesto menos 1 electrón.

En la **tabla 11**, se relacionan los compuestos fenólicos de bajo peso molecular identificados en los vinos analizados así como el sistema por el que se han detectado. También se indica en la tabla si se ha dispuesto o no de sustancias patrón para poder comparar los resultados obtenidos con los de las muestras problema y si la identificación se ha llevado a cabo por comparación de los resultados con la información existente en la bibliografía. En la misma tabla se indican los grupos de vinos en los que se han detectado cada uno de los compuestos. En total se han identificado en estos vinos, 33 compuestos fenólicos distintos. En la parte izquierda de la tabla figura el número que le hemos asignado en los cromatogramas a los compuestos fenólicos y que corresponde al orden de elución de los mismos. En la **figura 22**, se muestran a modo de ejemplo los cromatogramas correspondientes a uno de los vinos espumosos elaborados con la variedad de uva blanca Parellada, y uno de los vinos espumosos elaborados con la variedad de uva tinta Trepát.

Tabla 11. Compuestos fenólicos identificados en los vinos. Se indica también si se dispuso de patrones o la identificación se ha basado en la información bibliográfica así como el si se han detectado por DAD y/o MS y en qué vinos se han detectado.

Nº	COMPUESTO	Patrones	Inf bib ^a .	Detección		Vinos (variedad)				
				DAD	MS	Par	Tip	Tre	Mon	Gar
Ácidos hidroxibenzoicos										
1	Ácido gálico	*		*	*	*	*	*	*	*
3	Ácido protocatéquico	*		*	*	*	*	*	*	*
5	Ácido 2-furanoico	*		*	*	*	*	*	*	*
7	Ácido p-hidroxibenzoico	*		*		*	*	*	*	*
14	Ácido vainílico							*	*	*
16	Ácido siringico							*	*	*
Ácidos hidroxicinámicos										
15	Ácido trans-cafeico	*		*	*	*	*	*	*	*
17	Ácido cis-cafeico									*
18	Ácido trans-p-cumárico	*		*	*	*	*	*	*	*
19	Ácido cis-p-cumárico	*		*	*	*	*	*	*	*
Ésteres hidroxicinámicos										
4	cis-caftárico	*		*	*	*	*	*	*	*
6	trans-caftárico			*	*	*	*	*	*	*
8	cis-cutárico			*	*	*	*	*	*	*
10	trans-cutárico			*	*	*	*	*	*	*
12	cis-fertárico			*	*	*	*	*	*	*
13	trans-fertárico			*	*	*	*	*	*	*
23	cis o trans-caferoil etil tartárico	*		*	*	*		*		*
24	cis o trans-caferoil etil tartárico	*		*	*	*		*		*
29	cis o trans-etil cafeato		*	*	*		*			*
30	cis o trans-etil cafeato			*	*	*				*
31	cis o trans-dietil furoil tartárico		*	*	*				*	
32	cis o trans etil cumarato		*	*	*	*	*	*	*	*

Tabla 11. (continuación)

Nº	COMPUESTO	Patrones	Inf bib ^a .	Detección		Vinos (variedad)				
				DAD	MS	Par	Tip	Tre	Mon	Gar
Estilbenos										
22	trans-glucósido de resveratrol		(*)	*		(*)		(*)		
27	cis-glucósido de resveratrol			*	*	*	*	*	*	
28	trans-resveratrol	*						(*)	(*)	
33	cis-resveratrol				(*)	(*)	(*)	(*)	(*)	
Otros compuestos no flavonoideos										
2	Desconocido (derivado del furfural)			*	*	*	*	*	*	*
9	Tirosol	*		*	*	*	*	*	*	*
26	Triptofol	*		*	*	*	*	*	*	*
Compuestos flavonoideos										
11	Catequina								*	*
20	2R,3R dihidroquercetina		*						*	*
21	2R,3R dihidrokempferol 3-o-β-D-glucósido		*	*	*	*	*	*	*	*
25	Derivado del lignano ^b							*	*	*

Par: vinos Parellada; **Tip:** vinos Tipus; **Tre:** vinos Trepas; **Mon:** vinos Monastrell; **Gar:** vinos Garnacha

DAD: Identificados mediante el empleo del detector de fotodiodos alineados;

MS: Identificados mediante el empleo del detector de espectrometría de masas.

(*): identificación tentativa

^a : Identificados según los trabajos de Somers y col. (1987) y Badeshneider y Winterhalter (2001).

^b: 2R, 2R-2,3 Dihidro-2-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-3- (glucosilmetil)-7-hidroxi-5-benzofuranopropanol.

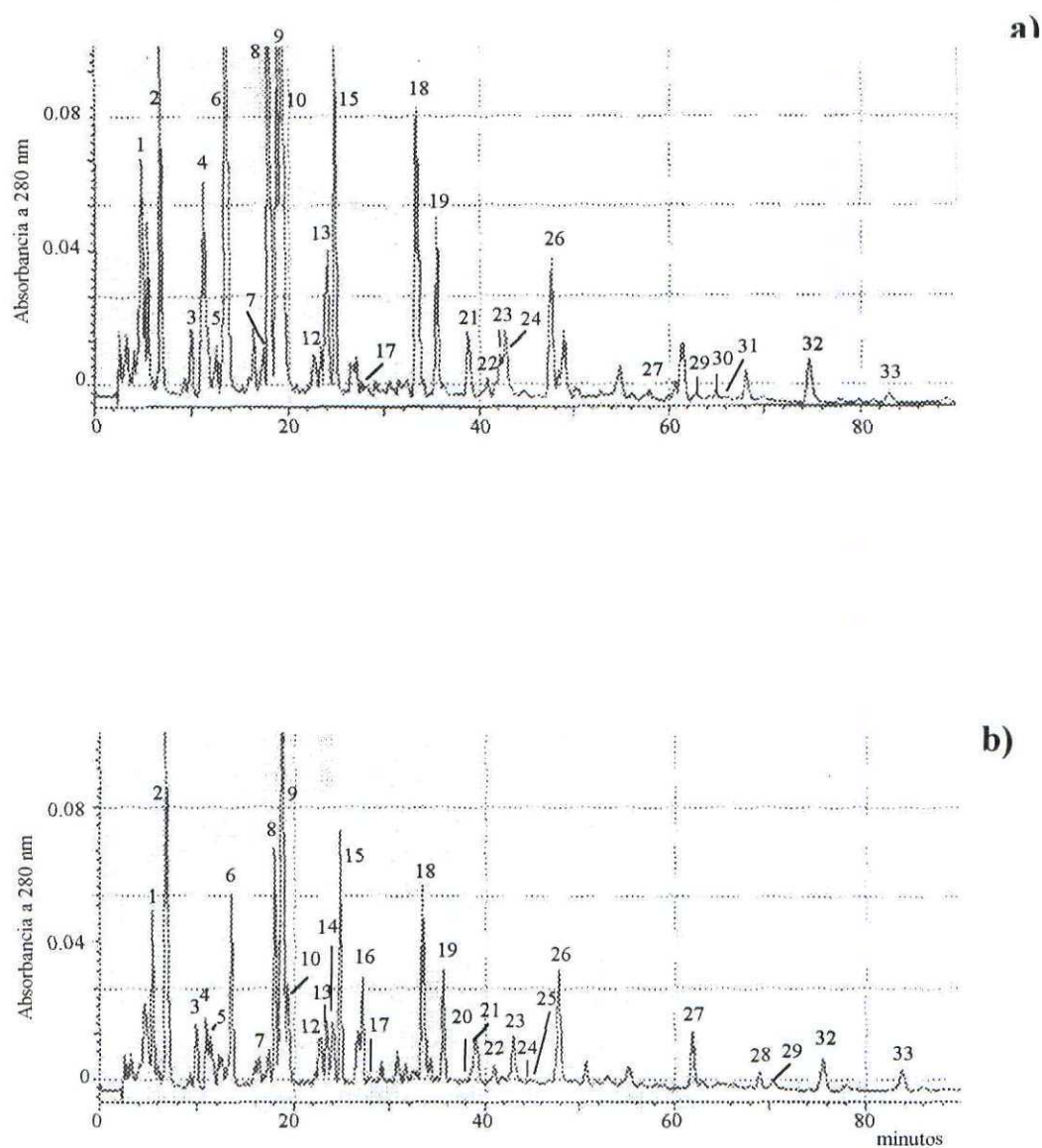


Figura 22. Cromatogramas correspondientes al análisis de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular, en las condiciones descritas en el apartado 2.3.1 de a) un vino espumo Trepát, y b) un vino espumoso Parellada.

En algunos compuestos identificados, se ha concretado el enantiómero de que se trata, es decir se ha dado información de la orientación espacial de los sustituyentes, por ejemplo en el caso de los picos 20 y 21. Esto ha sido posible porque nos hemos basado para su identificación en los trabajos bibliográficos, que han empleado otras técnicas como la resonancia magnética nuclear (RMN), que es la única técnica que permite conocer la disposición espacial de los sustituyentes. Algunos de los compuestos que se han identificado tienen la misma masa molecular, aunque sus espectros de ultravioleta son diferentes, y eluyen a distintos tiempos de retención, por lo que probablemente son isómeros conformacionales de un mismo compuesto, y por eso en la **tabla 11**, no se especifica el isómero de que se trata. Este es el caso de los picos 23 y 24, que corresponden al *cis* o *trans* caferoil etil tartárico o los picos 29 y 30, que serían el *cis* o *trans* etilcafeato. Estos compuestos, así como los picos 20, 25, 31, y 32, no se han descrito hasta el momento en vinos espumosos, y algunos de ellos se han descrito recientemente en vinos tranquilos elaborados con la variedad Riesling, gracias al empleo de novedosas técnicas analíticas (Baderschneider y Winterhalter, 2001).

3.3.1 Compuestos de los que se ha dispuesto de patrones comerciales

La identificación de los ácidos gálico y protocatéquico (pico 1 y pico 3), 2-furanoico (pico 5), *p*-hidroxibenzoico (pico 7), tirosol (pico 9), catequina (pico 11), ácido vainillínico (pico 14), ácido cafeico (pico 15), ácido siríngico (pico 16), ácidos *cis* y *trans* *p*-cumárico (picos 18 y 19), triptofol (26), y *trans*-resveratrol (pico 28), catese realizó por comparación de las características cromatográficas y espectrales con las de los correspondientes patrones comerciales. Con el empleo del detector de espectrometría de masas, se confirmó la identidad de todos ellos.

Los ácidos vainillínico y siríngico, han sido analizados exclusivamente en los vinos elaborados con variedades tintas y no en los obtenidos con variedades blancas. Con el empleo del detector de espectrometría de masas, se ha podido corroborar la presencia de estos compuestos. El ácido vainillínico, es la primera vez, que se ha descrito en vinos espumosos, posiblemente debido a que este ácido es más abundante en variedades tintas que en blancas, y no hay prácticamente trabajos en la bibliografía en los que se determine la composición fenólica de vinos espumosos elaborados

únicamente con variedades tintas. En la **figura 23**, se muestra el espectro de UV, y el de MS, correspondiente a estos dos ácidos, en uno de los vinos analizados. En todos los espectros de masas que se muestren aparecerá el ión molecular, correspondiente al peso molecular del compuesto menos un electrón, ya que la ionización se produce en modo negativo.

Betés-Saura y col. (1996), determinan por primera vez en vinos blancos elaborados con variedades de uvas del Penedés los ácidos benzoicos, protocatéquico y sirínico, sin embargo, no determinan ácido vainillínico en ninguno de los vinos que analizan. Ibern-Gómez y col (2000), sin embargo, no analizan ácido sirínico, en los vinos espumosos elaborados con estas mismas variedades. En los vinos objeto de estudio, el ácido vainillínico, y sirínico, únicamente se han encontrado en vinos elaborados a partir de variedades tintas, mientras que el ácido protocatéquico, aparece indistintamente en vinos elaborados con variedades blancas y tintas.

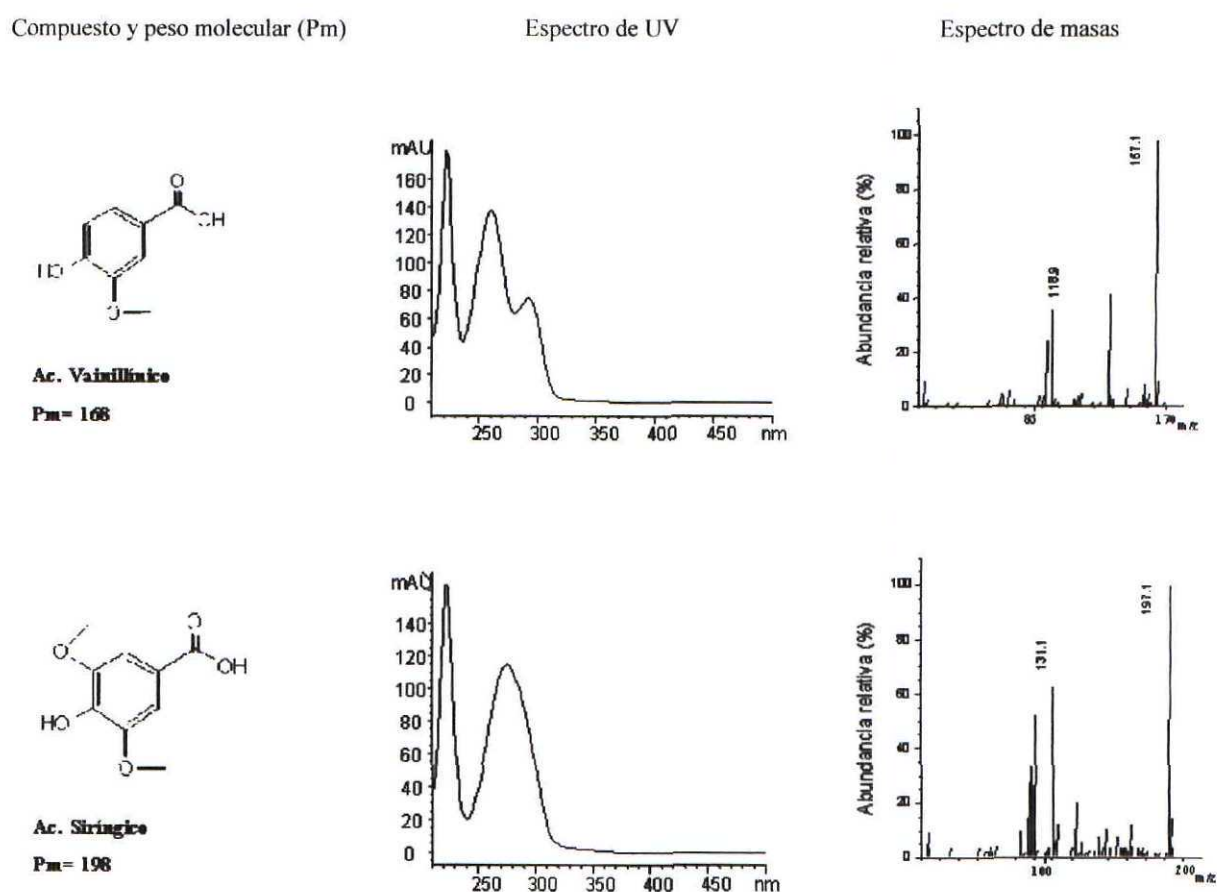


Figura 23. Estructura química, espectros de UV-vis y de masas, de los ácidos vainillínico y sirínico, determinados en los vinos elaborados con variedades tintas.

Otro de los compuestos que exclusivamente ha sido identificado en los vinos espumosos elaborados con variedades de uvas tintas, es la catequina, que no se ha determinado en los vinos elaborados con variedades blancas. Sin embargo, otros autores han determinado este compuesto de tipo flavonoideo en los vinos base y espumosos elaborados con variedades blancas del Penedés (Betés-Saura y col., 1996; Ibern-Gómez y col., 2000).

3.3.2 Compuestos identificados por los parámetros espectrales clásicos y otros parámetros descritos por Bartolomé y col. (1993).

Para comprobar la identidad de los ácidos cis y trans p-cutárico (picos 8 y 10), trans-caftárico (pico 6), y trans-fertárico (pico 13), que tienen espectros de UV bastante similares, los parámetros espectrales clásicos, posición de los máximos de las bandas espectrales, relaciones entre los valores de absorbancia a distintas longitudes de onda, o la obtención de funciones derivadas de los espectros, se pueden emplear para identificar los compuestos derivados del ácido cumárico (cis y trans p-cutárico), sin embargo no permiten la identificación entre derivados de los ácidos ferúlico y cafeico. Para la identificación de estos compuestos se han empleado entonces otros parámetros espectrales descritos por Bartolomé y col. (1993), el *intervalo de convexidad*, la diferencia entre los puntos máximo y mínimo en la primera derivada de la curva espectral, y la *distancia mínimo-máximo*, que corresponde a la diferencia entre el máximo de la banda 3 del espectro y el máximo de la segunda derivada del espectro. Estos parámetros han permitido identificar correctamente estos compuestos como se pudo confirmar por espectrometría de masas.

3.3.3 Estilbenos

El cis-resveratrol se obtuvo por isomerización del trans-resveratrol exponiendo una solución de este compuesto durante una hora a la luz ultravioleta (340 nm) lo que permitió su identificación en los vinos. Los glucósidos trans y cis del resveratrol (picos 22 y 27) eluyen en un tiempo de retención menor que las formas libres (picos 28 y 33) ya que son más hidrófilas. Su identificación se llevó a cabo por comparación de sus espectros ultravioleta con los de las agliconas correspondientes.

3.3.4 Compuestos fenólicos no descritos previamente en vinos espumosos.

Además del ácido vainillínico, que como se ha comentado anteriormente es la primera vez que se describe en vinos espumosos elaborados con variedades tintas, probablemente debido a que este compuesto es más abundante en estas variedades que en las blancas, gracias al empleo de todos los métodos de identificación disponibles, espectros UV-vis, información bibliográfica y especialmente el espectro de masas, se ha podido identificar una serie de compuestos fenólicos derivados de los ácidos hidroxicinámicos, que presentaban espectros de UV en algunos casos muy parecidos entre sí. Estos compuestos son los dos isómeros del éster tartárico del ácido etilcafeico o caferoil etil tartárico (picos 23 y 24), los dos isómeros del ester etílico del ácido cafeico o etilcafeato (picos 29 y 30), uno de los isómeros, cis o trans, del ester tartárico del dietilferúlico o dietilferuloiltartárico (pico 31) y el ester etílico del ácido cumárico o cumaroiletiltartárico (pico 32). Todo ellos se han descrito por primera vez en vinos espumosos, y en vinos tranquilos han sido descritos exclusivamente en los elaborados con la variedad de uva blanca Riesling (Somers 1987, y Badeshneider y Winterhalter 2001). El hecho de que todos estos compuestos derivados de ácidos hidroxicinámicos presenten espectros de UV-Vis similares entre sí dificulta su identificación, y en estos casos el detector de espectrometría de masas, ha resultado muy útil, ya que aunque los espectros de UV-vis, puedan ser similares, los espectros de masas, son diferentes. Basándonos en esto, y en la descripción bibliográfica de estos compuestos en los únicos trabajos en los que han sido identificados, se ha podido elucidar su estructura en los vinos estudiados. En la **figura 24**, se muestran los espectros de UV-vis tanto de los ácidos hidroxicinámicos y ésteres respectivos que han sido identificados en los vinos espumosos, y que comúnmente aparecen en los vinos, como aquellos que hasta ahora no se habían identificado en vinos espumosos. También se representa la estructura química de cada compuesto junto con el peso molecular teórico.

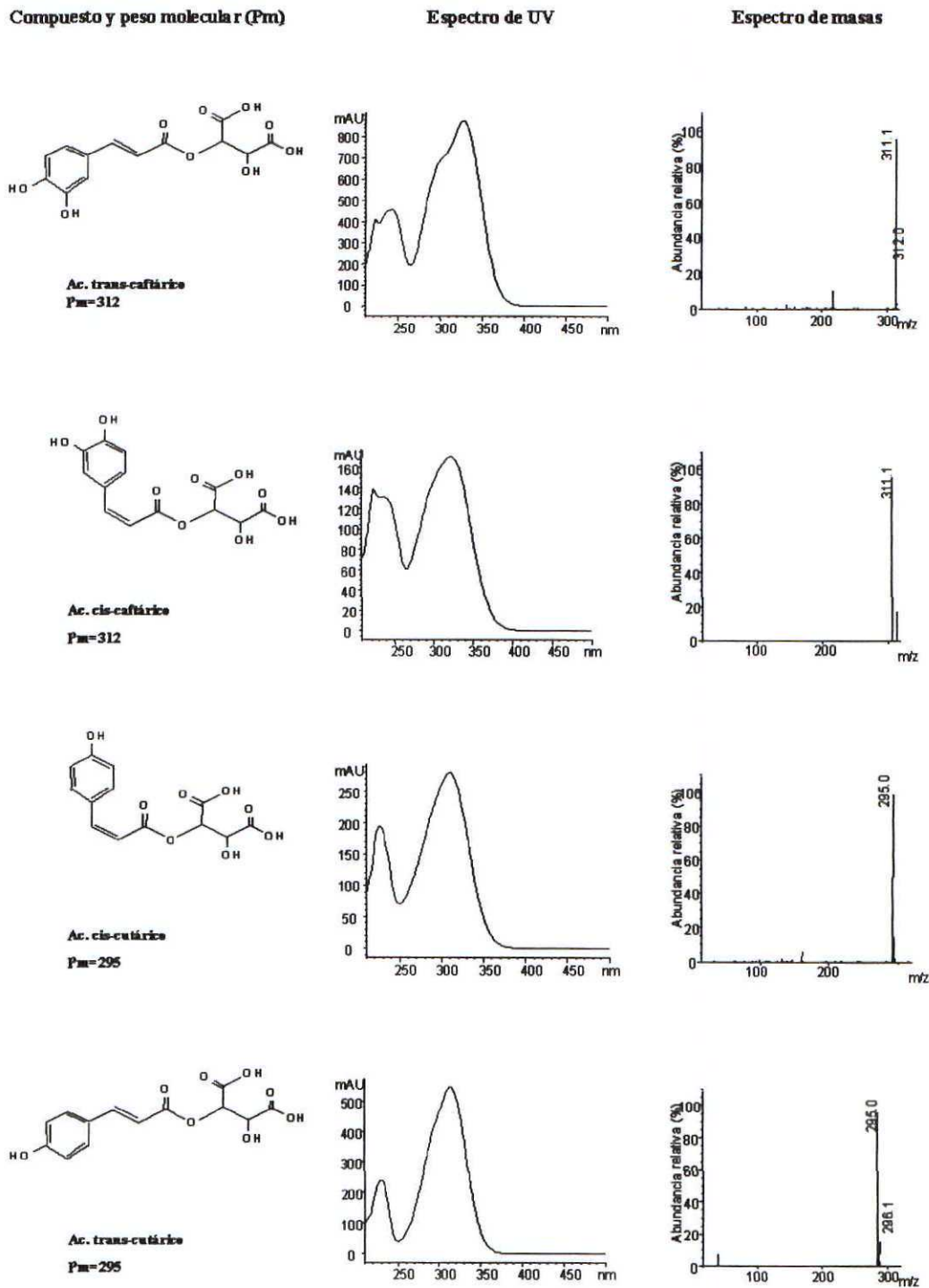
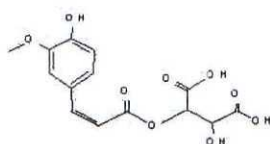


Figura 24. Estructura química, espectros de UV-vis y masas, de los ácidos hidroxicinámicos y derivados de estos, determinados en los vinos estudiados.

Compuesto y peso molecular (Pm)

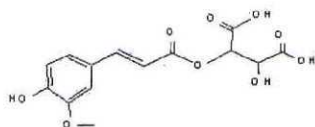
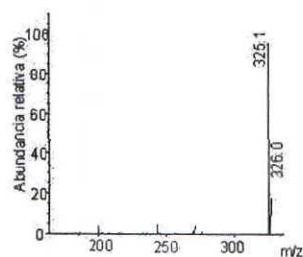
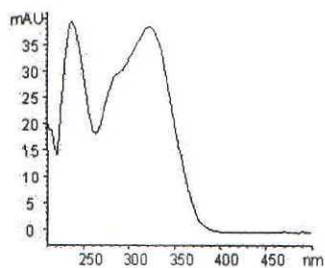
Espectro de UV

Espectro de masas



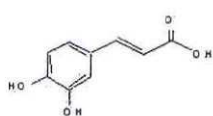
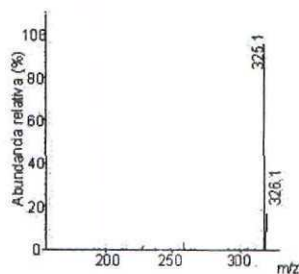
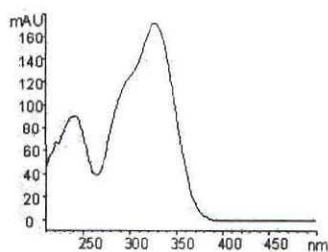
Ac. cis-fertárico

Pm=326



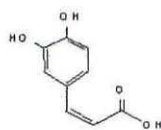
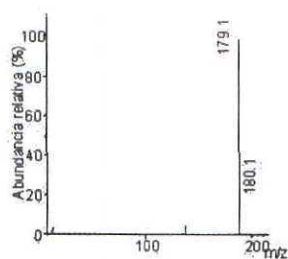
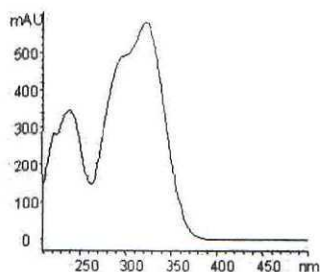
Ac. trans-fertárico

Pm=326



Ac. trans-cafeico

Pm=180



Ac. cis-cafeico

Pm=180

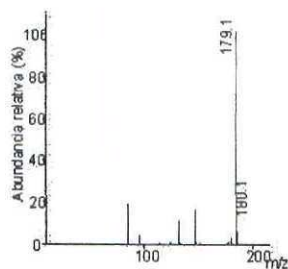
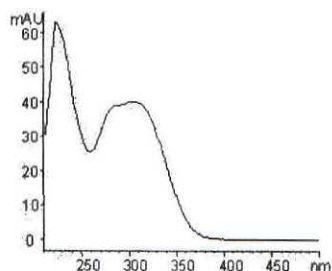


Figura 24. (continuación)

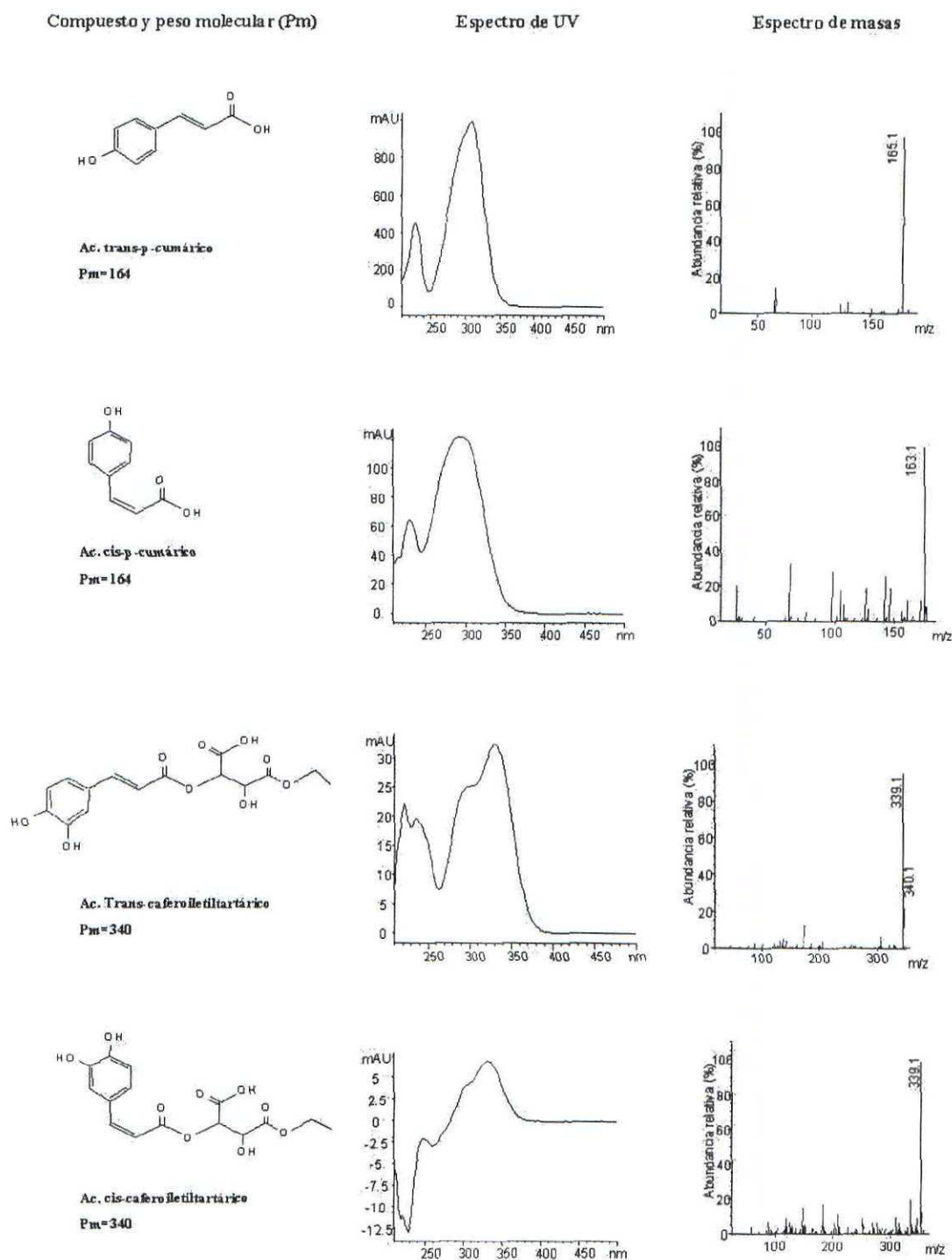


Figura 24. (Continuación)

Compuesto y peso molecular (Pm)

Espectro de UV

Espectro de masas

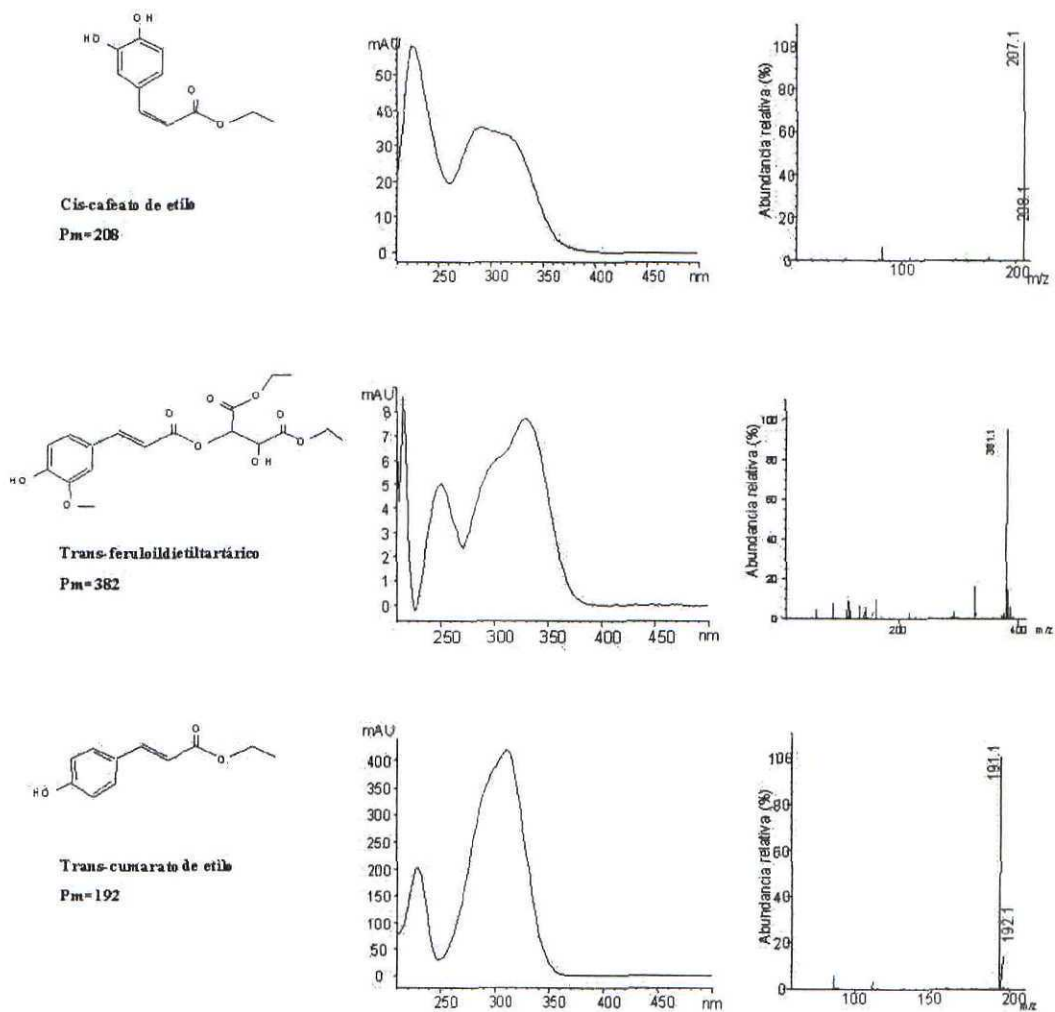


Figura 24. (Continuación)

Además de los derivados hidroxicinámicos, se han determinado otros compuestos de tipo flavonoideo, que hasta el momento no se habían descrito en los vinos espumosos. Estos compuestos se corresponden con los picos 21, 20 y 25. El pico 21, corresponde al hidroflavonol, 2R, 2S, dihidrokaempferol 3-o- β -D-glucósido. Aunque los fenoles flavonoideos son cuantitativamente más importantes en los vinos de variedades tintas, pueden aparecer en los vinos de variedades blancas. Nosotros, hemos encontrado este compuesto en los vinos elaborados con la variedad blanca Parellada. Las características espectrales, máximo de UV a 286 nm, y el espectro de MS, en el que aparece como ión mayoritario el de relación m/z de 449, coinciden con el mismo compuesto descrito por Badesheider y Winterhalter (2001) en vinos de la variedad Riesling. En la **figura 25**, se muestra el espectro de UV, y el de masas correspondiente a este compuesto

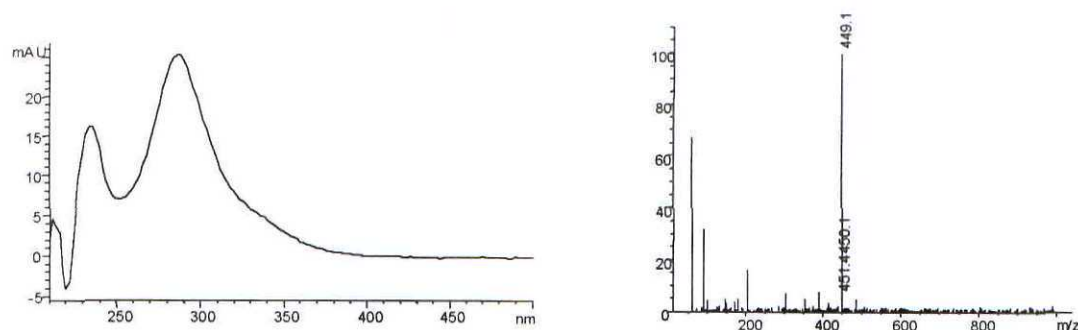


Figura 25. Espectro de UV-vis y de masas del compuesto identificado como 2R, 3R, dihidrokaempferol 3-o- β -D-glucósido, de uno de los vinos estudiados..

Además de este último compuesto de tipo flavonoideo que se ha determinado tanto en los vinos elaborados con variedades blancas como en tintas, los otros dos nuevos compuestos de tipo flavonoide se han identificado exclusivamente en los vinos elaborados con variedades tintas. Estos compuestos son la 2 R, 3R, dihidroquercetina (pico 20), que ha sido determinada en los vinos elaborados con Monastrell y Garnacha, y un compuesto que en la tabla 11 aparece identificado como derivado lignano (pico 25) en los vinos elaborados con las variedades Trepát y Garnacha. Este último, corresponde al compuesto descrito por Badesheider y Winterhalter (2001), como el 2R,2R-2,3-dihidro-2-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-3-(glucosilmetil)-7-hidroxi-5-benzofuranopropanol. El espectro de UV y el de MS, de estos compuestos se muestran en la **figura 26**. El hecho de que estos compuestos de tipo flavonoideo, hayan sido determinados indistintamente en vinos elaborados con vinificación en blanco (Trepát y Monastrell), y en rosado (Garnacha), querría decir que estos compuestos, que normalmente se encuentran en las partes sólidas de la uva, como hollejos y pepitas, no sólo difunden al mosto durante la maceración que se produce en el caso de la vinificación en rosado, sino que la suave prensada a la que se someten las uvas sería suficiente para extraer este tipo de compuestos, ya que se encuentran en los vinos que no han estado sometidos a maceración. También algunos autores, (Bourzeix y col., 1986; Ricardo da Silva y col., 1992) han comprobado que aunque algunos compuestos flavonoideos, especialmente 3-flavanoles se localizan fundamentalmente dentro de la baya de la uva, en las semillas, se han detectado también trazas de monómeros y dímeros en la pulpa.

Cheyner y Rigaud (1986), observaron que el flavonol mayoritario que está presente en hollejos de uvas tintas, es la quercetina-3-glucurónido. En los vinos estudiados, sin embargo, no se ha determinado. Betés-Saura y col., (1996), confirman su presencia en vinos procedentes de variedades blancas, con un detector de espectrometría de masas, e Ibern-Gómez y col., (2000), cuantifican este compuesto en vinos espumosos elaborados con variedades blancas, aunque en muy baja concentración, de 0,08 a 0,09 mg/L. En ninguno de los vinos estudiados se ha podido confirmar la presencia de este compuesto.

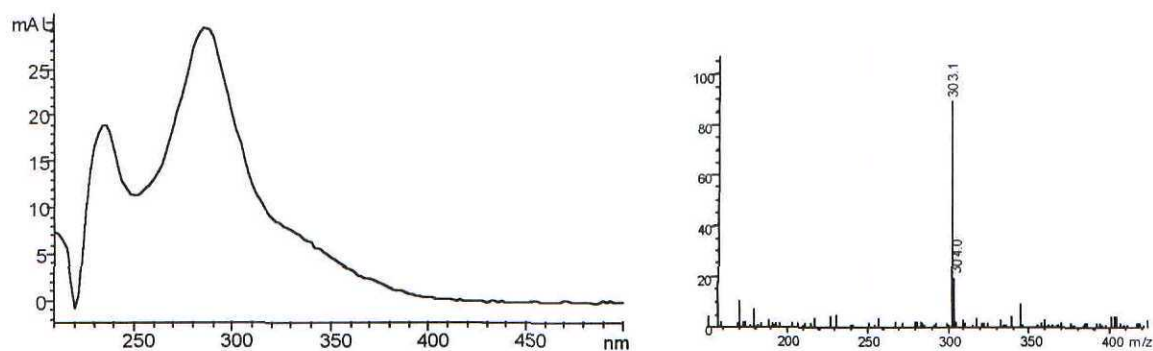


Figura 26. Estructura química, espectros de UV-vis y masas de los compuestos identificados como 2R,2S dihidroquercetina y 2R,2R-2,3-dihidro-2-(4'-hidroxi-3'-metoxifenil)-3-(glucosilmetil)-7-hidroxi-5-benzofuranopropanol.

3.4 Composición global de los vinos estudiados

Se denominan determinaciones de la composición global o determinaciones convencionales a las que se realizan habitualmente en bodegas y laboratorios de control y dan una información general de la composición de los vinos.

3.4.1 Composición global del vino base y de los vinos espumosos elaborados con diferentes cepas de levadura y con adición o no de bentonita en la solución de tiraje.

En la **tabla 12**, se muestran los datos de la composición global del vino base y de los vinos espumosos de 40 días elaborados con las cepas de levadura EC1118, IFI-473, IFI-475, P-29 y J y con adición o no de bentonita en el licor de tiraje. Una descripción más detallada de estos vinos aparece en el apartado 2.1.1 de Materiales y Métodos. Todos los vinos fermentaron a sequedad. A los 20 días el grado alcohólico de los vinos oscilaba entre 10,1 y 10,4 (datos no presentados) y a los 40 días la fermentación había terminado en todos los vinos y tenían de 10,4 a 10,7 grados alcohólicos. Los resultados indican que la fermentación se desarrolló adecuadamente y que los vinos obtenidos tienen una composición que se puede considerar normal en este tipo de vinos, siendo similares a los reportados por Pueyo (1994) y Andrés-Lacueva (1996). Los resultados obtenidos se encuentran en el rango que establece la Normativa vigente para este tipo de vinos espumosos. No se observan diferencias en estos parámetros entre los vinos obtenidos con cepas diferentes ni por el uso o no de bentonita en el licor de tiraje.

Tabla 12. Composición global del vino base y de los vinos espumosos elaborados con distintas cepas de levadura y sin (s) o con (c) adición de bentonita en la solución de tiraje.

	Vino base	Vinos espumosos									
		Cepa <i>EC1118</i>		Cepa <i>IFI-473</i>		Cepa <i>IFI-475</i>		Cepa <i>P-29</i>		Cepa <i>J</i>	
		s	c	s	c	s	c	s	c	s	c
Grado alcohólico	9,4	10,5	10,7	10,4	10,7	10,5	10,6	10,6	10,7	10,6	10,7
Acidez volátil (g ac. acético/L)	0,17	0,33	0,18	0,23	0,22	0,26	0,27	0,26	0,26	0,25	0,28
Acidez total (g ac. tartárico/L)	6,06	6,14	6,04	6,09	5,97	6,08	6,04	5,85	5,76	6,1	5,85
pH	3,21	3,33	3,33	3,35	3,34	3,37	3,35	3,34	3,36	3,33	3,34
Azúcares reductores (g glucosa/L)	1,54	1,54	1,49	1,59	1,48	1,31	1,52	1,24	1,52	1,61	0,97
Ácido tartárico (g/L)	2,90	3,00	3,04	2,90	3,02	3,05	3,04	3,02	2,94	3,03	2,97
SO ₂ total (mg/L)	51,04	54,72 *	51,04	51,04	51,04	54,23	57,42	54,23	51,04	51,04	54,23
Polifenoles totales (mg ac. gálico/L)	259,1	244,2	230,7	238,5	247,7	247,7	258,4	259,8	264,1	269,8	264,1
Intensidad del color (A 420 nm+A 520 nm)	0,124	0,108	0,120	0,114	0,108	0,110	0,119	0,113	0,103	0,119	0,109

Datos de 40 días, excepto * que es de 20 días; s= sin bentonita; c= con bentonita

3.4.2 Composición global de los vinos espumosos de la variedad Parellada procedentes de uvas de viñas sometidas a elevada explotación (vinos PA1 y PA2) y de uvas de viñas cultivadas según las prácticas tradicionales de la zona del cava.

En la **tabla 13** se muestran los resultados obtenidos de las determinaciones realizadas en los vinos espumosos de 9 meses de envejecimiento, elaborados con la variedad Parellada. Una descripción detallada de estos vinos se muestra en el apartado 2.1.2, de Materiales y Métodos.

Los valores obtenidos de la composición de estos vinos en los distintos análisis realizados se encuentran en el rango de los establecidos en reglamentación de la Denominación *cava* con excepción de la acidez total, en todos estos vinos, se encuentra por debajo de lo establecido, que es como mínimo 5,5 a 9,8 g de ácido tartárico/L. La acidez volátil, aunque se encuentra dentro de los valores normales de los vinos es menor en los vinos Parellada B que en los vinos Parellada A.

Del resultado del análisis de los ácidos málico y láctico en estos vinos, se deduce que en los vinos A1 y A2 han realizado la fermentación maloláctica. Probablemente se debe a que los vinos A tenían menos anhídrido sulfuroso (73,5 y 89 mg/L respectivamente) que los B (139-164 mg/L). Esta puede ser la causa también de que la intensidad de color de los vinos A sea mayor que la de los B, es decir, están mas oxidados.

Tabla 13. Composición global de los vinos espumosos de 9 meses de envejecimiento elaborados con la variedad Parellada.

	Parellada A1	Parellada A2	Parellada B1	Parellada B2
Grado alcohólico (% v/v)	10,9	10,9	10,7	10,4
Acidez volátil (g ac. acético/L)	0,33	0,34	0,11	0,15
Acidez total (g ac. tartárico/L)	3,19	3,54	3,49	3,79
pH	3,22	3,15	3,14	3,08
Ácido tartárico (g/L)	2,7	2,88	2,26	2,69
Ácido L (-)-málico (g/L)	0,06	0,32	1,58	1,52
Ácido L (+)-láctico (g/L)	1,13	0,92	0,10	0,12
SO ₂ total (mg/L)	73,5	89	139	164
Intensidad de color (A420 + A 520)	0,09	0,08	0,06	0,065

3.4.3 Composición global de los vinos espumosos elaborados con uvas de las variedades tintas Trepat, Monastrell vinificadas en blanco y con uvas de la variedad Garnacha vinificadas en rosado.

En la **tabla 14** se muestran los resultados de las determinaciones analíticas correspondientes a la composición global de los vinos base y de los vinos espumosos de 9 meses elaborados con las variedades Trepat, Monastrell y Garnacha. Las características de elaboración de estos vinos se describen en el apartado 2.1.3 de Materiales y Métodos.

El grado alcohólico de los vinos base se encuentra comprendido entre 9,8 y 10,9. Los vinos espumosos tras la segunda fermentación han aumentado algo más de 1,3 el grado alcohólico, excepto en el vino espumoso elaborado con la variedad Garnacha en el que el aumento fue algo menor, de 0,9 grados.

También en estos vinos todos los valores obtenidos en los distintos análisis de la composición global realizados a los vinos base y a los vinos espumosos, se encuentran en el rango de lo establecidos en la Reglamentación al respecto. Tan sólo el vino base y el espumoso Monastrell 2, tienen una cantidad de sulfuroso total algo superior a la legalmente establecida, que es menor a 170 mg/L.

Los vinos base de las variedades Trepat y Monastrell han realizado parcialmente la fermentación maloláctica y los vinos espumosos de la variedad Trepat la completaron posteriormente. Como era de esperar, el vino base y el espumoso elaborado con la variedad Garnacha tienen más intensidad de color, ya que han sido vinificados en rosado.

3.4.4 Composición global del vino base y los vinos espumosos denominados *Tipus* y de los vinos de mezcla.

En la **tabla 15**, se puede observar que tanto los vinos *Tipus* como los vinos de mezcla, tienen una composición global similar al resto de vinos estudiados, y todos los valores están dentro de los normales para este tipo de vinos.

Tabla 14. Composición global de los vinos base y de los vinos espumosos elaborados con las variedades de uvas tintas Trepat, Monastrell y Garnacha.

	Trepat 1		Trepat 2		Monastrell 1		Monastrell 2		Garnacha	
	V base	V esp	V base	V esp	V base	V es	V base	V esp	V base	V esp
Grado alcohólico (% v/v)	9,86	11,4	9,81	11,4	10,96	12,33	10,99	12,32	10,69	11,66
Acidez volátil (g ac. acético/L)	0,42	0,47	0,43	0,49	0,49	0,59	0,74	0,7	0,21	0,21
Acidez total (g ac. tartárico/L)	3,66	3,2	3,66	3,23	3,77	3,68	3,16	3,22	5,1	5,0
pH	3,23	3,25	3,24	3,27	3,22	3,22	3,36	3,34	3,05	3,07
Ácido Tartárico (g/L)	2,53	2,45	2,52	2,45	1,81	1,9	1,73	1,9	-	-
Ácido L (-)-málico (g/L)	0,97	0,05	0,96	0,04	1,38	0,77	0,88	0,77	1,1	1,00
Ácido L (+)-láctico (g/L)	0,72	1,30	0,78	1,3	0,06	0,71	0,06	0,74	-	-
SO ₂ total (mg/L)	84,5	71	86	72,5	249	209,5	161,5	147	60	44
Intensidad del color (A 420 nm+A 520 nm)	0,18	0,14	0,19	0,14	0,26	0,16	0,29	0,19	0,83	0,67

V base: Vino base; V esp: Vino espumoso de 9 meses de envejecimiento.

Tabla 15. Composición global del vino base y de los vinos espumosos Tipus, así como de los vinos espumosos elaborados con mezclas del vino Tipus y los vinos Trepát y Monastrell.

	Tipus		Trepát 1 50%	Trepát 2 50%	Monastrell 1 25%	Monastrell 2 25%
	Vbase	V 9m	V 9m	V 9m	V 9m	V 9m
Grado alcohólico (% v/v)	10,29	11,04	11,48	11,59	11,7	11,7
Acidez volátil (g ac. acético/L)	0,20	0,22	0,34	0,32	0,28	0,33
Acidez total (g ac. tartárico/L)	4,25	4,13	3,8	3,75	3,93	3,82
pH	2,90	2,92	3,06	3,06	2,99	3,02
Ácido tartárico (g/L)	3,63	3,58	2,93	2,81	2,98	2,98
Ácido L (-) málico (g/L)	0,75	0,67	0,92	0,69	0,82	0,58
Ácido L (+) láctico (g/L)	0,73	0,72	0,83	0,81	0,55	0,75
SO ₂ total (mg/L)	83	76	74,5	72	107,5	87,5
Intensidad del color (A 420 nm+A 520 nm)	0,1	0,08	0,11	0,11	0,10	0,11

Tipus: Vino Tipus (mezcla de variedades blancas); Trepát 1 50%: 50%Vino Trepát 1 y 50% vino Tipus; Trepát 2: 50% Vino Trepát 2 y 50% vino Tipus; Monastrell 1 25%: Monastrell 1 25% y 75% vino Tipus; Monastrell 2 25%: 25% Monastrell 2 y 75% vino Tipus.

3.5 Composición nitrogenada de los vinos base y espumosos.

En las **tablas 16, 17, 18, 19 y 20**, se muestran los valores correspondientes a los distintos compuestos nitrogenados determinados en los vinos base y vinos espumosos estudiados.

3.5.1 Composición nitrogenada del vino base y de los vinos espumosos elaborados con diferentes cepas de levadura y con adición o no de bentonita en la solución de tiraje.

En la **tabla 16** se muestran los valores de concentración de los compuestos nitrogenados estudiados (nitrógeno total, aminoácidos libres y proteínas), del vino base y de los vinos espumosos elaborados con las diferentes cepas de levaduras, a lo largo del envejecimiento, y con adición o no de bentonita en el licor de tiraje.

Martínez-Rodríguez (2000) comprobó, en estos mismos vinos, que el tiempo de envejecimiento influía en la concentración de nitrógeno total, pero no la cepa de levadura que se emplea en la segunda fermentación, ni la utilización o no de bentonita en el licor de tiraje. La concentración de aminoácidos, en cambio, está influida significativamente tanto por el tiempo de envejecimiento como por la cepa de levadura, pero no por la adición de bentonita y la concentración de proteínas, está influida significativamente por las variables bentonita y tiempo de envejecimiento pero no por la cepa de levadura.

Tabla 16. Concentración de nitrógeno total, proteínas, y aminoácidos libres del vino base y de los vinos espumosos elaborados con distintas cepas de levadura y sin (s) o con adición de bentonita en la solución de tiraje.

Cepa	Tiempo (días)	Nitrógeno total (mg/L)		Aminoácidos libres (mg Leu/L)		Proteínas (mg BSA/L)	
		c	s	c	s	c	s
	Vino Base		175,2		280,1		15,7
EC1118	20	133,7	133,1	176,7	157,5	17,6	16,2
	40	152	152,7	185,2	169,9	11	15,7
	90	155	155,6	199,1	208,8	11,6	12,2
	180	168,7	160,0	209	192,7	9,5	10,6
	270	146,5	152,6	292,7	298,2	13,4	24,1
	365	157,2	161,5	209,6	203,6	14,3	24,7
IFI-473	20	142,9	122,2	167,2	175	16,5	19,0
	40	152,1	151	197,9	189,3	9,2	10,4
	90	154	147,7	196,9	198,1	11	12,4
	180	152,8	157,2	204,4	230,1	9,2	10,4
	270	155,2	160,1	288,7	301,4	9,6	22,9
	365	170,8	165,3	230,2	214,1	14,4	23,3
IFI-475	20	132,5	141,5	198,1	162,8	16,8	17,4
	40	151	154,4	184,52	166,5	8,7	15,0
	90	151,5	145,8	209,3	165	11,2	11,7
	180	159,6	162,2	241,9	216,5	8,9	11,3
	270	154,2	175,4	309,3	284,8	14,9	18,7
	365	166,4	167,0	218,5	218,2	16,1	19,5
P-29	20	134,1	133,7	209,3	210,5	16,3	18,8
	40	134,1	154,4	227,5	258,9	8,3	14,6
	90	155,6	154,7	261,8	240,2	11,1	11,5
	180	160,7	159,7	263,6	275,5	9,6	10,4
	270	178	168,9	358,1	364,3	18,9	22,7
	365	169,6	173	252,9	257,6	20,5	21,4
J	20	141,2	141,54	193,7	205,4	17,7	20,9
	40	150,0	153,3	221,9	218	9,1	12,3
	90	150,7	157,23	236,1	231,9	11,2	12,2
	180	158,4	163,94	241,2	234,1	9,5	8,5
	270	152,0	155,82	366,3	354,5	13,4	21,4
	365	170,2	173,04	248,4	246,1	14,3	22,2

En la **figura 27** se representa, la evolución del contenido de nitrógeno total en los vinos analizados, agrupando en cada tiempo de envejecimiento, las distintas cepas de levaduras, y los vinos con y sin bentonita. Como puede comprobarse, el nitrógeno total disminuye durante los primeros 20 días de fermentación y aumenta posteriormente, y de forma gradual, hasta los 365 días, en que alcanza valores muy próximos a los que presentaba el vino base.

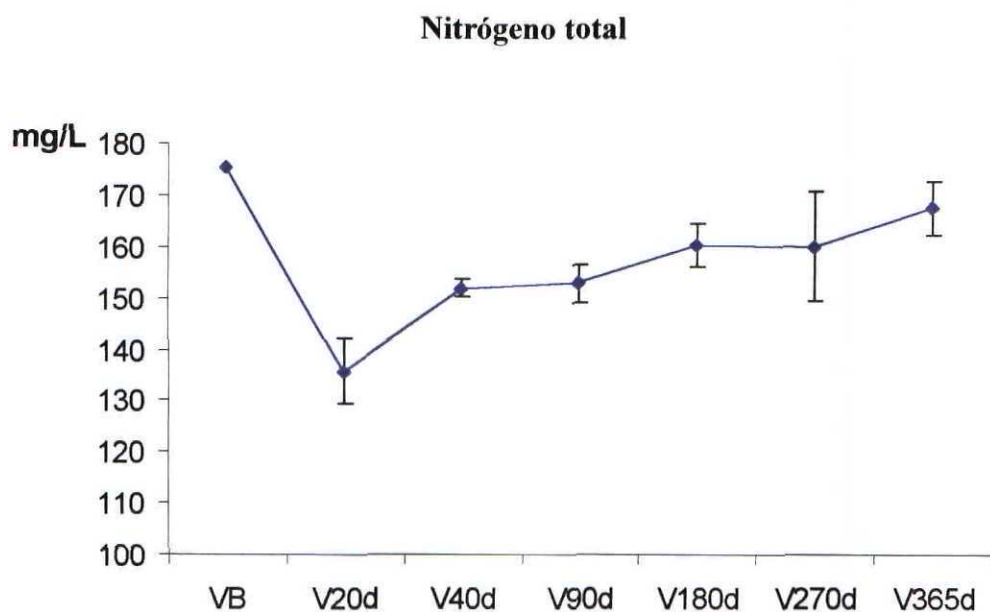


Figura 27. Concentración de nitrógeno total del vino base y de los vinos elaborados con las diferentes cepas de levadura, y con adición o no de bentonita en el licor de tiraje, durante la segunda fermentación y el envejecimiento.

En la **figura 28**, se representa la evolución en el tiempo del contenido de aminoácidos en los vinos elaborados con las diferentes cepas de levadura, agrupando a los vinos elaborados con y sin adición bentonita, ya que esta variable no influye en la concentración de estos compuestos. Se puede observar que durante los 20 primeros días de fermentación, las levaduras consumen una parte de los aminoácidos libres presentes en el vino base. Las cepas P-29 y J consumen en esta etapa menos aminoácidos que el resto de las cepas. Entre los 20 y 40 días, se produce un pequeño aumento en la concentración de aminoácidos libres. De los 40 a los 180 días, continúa produciéndose un aumento progresivo de la concentración de aminoácidos en los vinos. Entre los 180 y 270 días se observa un importante aumento de aminoácidos, alcanzándose a los 270 días, los valores más altos de concentración. A partir de los 270 y hasta los 365 días, se produce un descenso en la concentración de aminoácidos libres en todos los casos.

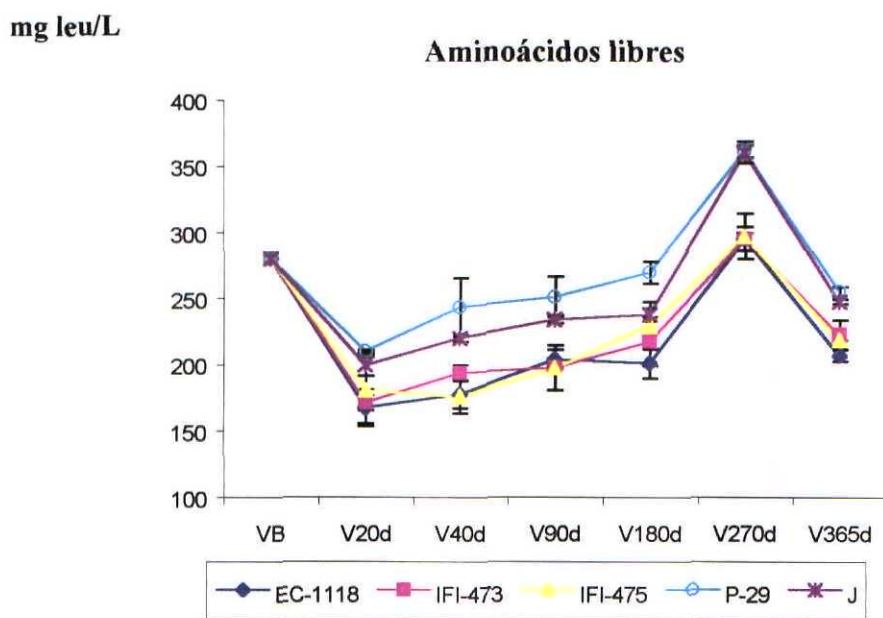


Figura 28. Concentración de aminoácidos libres del vino base y valor medio (\pm) la desviación típica de los vinos elaborados con las diferentes cepas de levadura durante la segunda fermentación y el envejecimiento.

Todos los vinos elaborados con las cepas P29 y J, tienen mayor cantidad de aminoácidos libres que los vinos elaborados con las cepas EC1118, IFI-473 en IFI-475 que son muy similares.

Como se comprobó en el análisis de varianza, la bentonita añadida en el licor de tiraje, influye en la concentración de proteínas de los vinos. En la **figura 29** se representa la evolución en el tiempo, del contenido de proteínas, en los vinos elaborados con y sin bentonita, agrupando los datos correspondientes a los vinos elaborados con distintas cepas de levadura ya que como se ha comentado con anterioridad, esta no influye en su concentración. La concentración de proteínas es menor en los vinos que se han elaborado utilizando bentonita en la solución de tiraje. En los vinos sin bentonita, el contenido de proteínas aumentó, aunque en concentraciones variables, en los primeros 20 días. Posteriormente, el contenido en proteínas fue disminuyendo hasta los 180 días de envejecimiento. Entre los 180 y los 270 días se produjo un notable incremento en proteínas que alcanzó concentraciones entre 19,7 a 24,7 mg BSA/ L. Finalmente, en el periodo comprendido entre los 270 y los 365 días, se observó un ligero aumento de las proteínas en todos los vinos.

La bentonita que se añade en el licor de tiraje, a pesar de encontrarse en concentraciones muy bajas (aproximadamente 30 mg/L) adsorbe al menos parte de las proteínas del vino. Las mayores diferencias entre el contenido de proteínas de los vinos elaborados sin bentonita y los vinos elaborados con ella, corresponden a los vinos de 270 y 365 días.

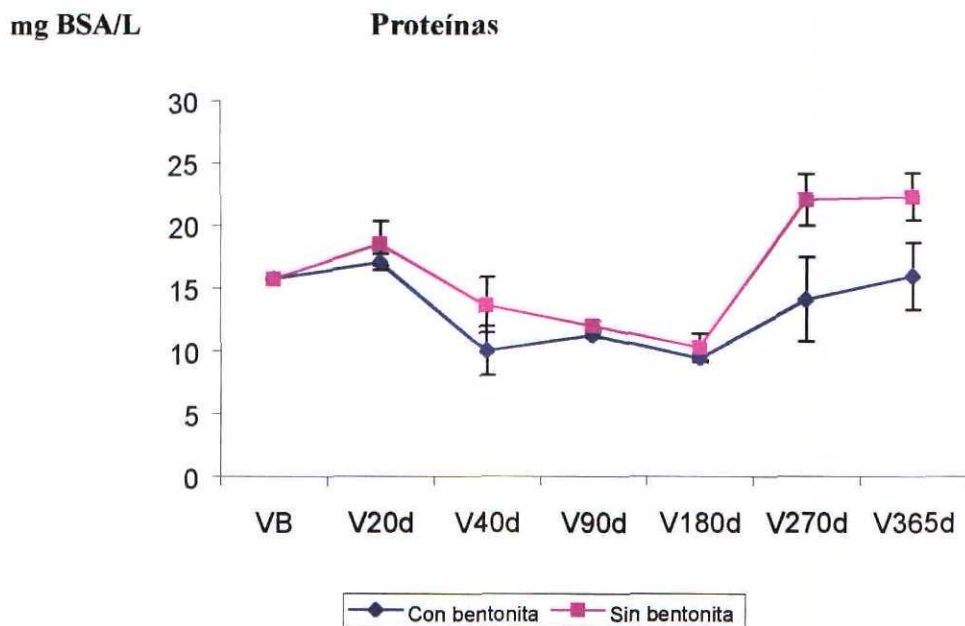


Figura 29. Concentración de proteínas del vino base y valor medio (\pm) desviación típica de los vinos elaborados con adición o no de bentonita en el tiraje, durante la segunda fermentación y el envejecimiento.

Martínez-Rodríguez (2000), explica los cambios globales observados en los compuestos nitrogenados, durante la segunda fermentación y el envejecimiento en botella de la siguiente forma: Durante los 20 primeros días después de la inoculación del vino con las levaduras, se desarrolla la mayor parte de la segunda fermentación, y por tanto se produce una disminución del contenido de nitrógeno total, coincidiendo con la etapa de multiplicación celular, en la que las levaduras consumen compuestos nitrogenados, fundamentalmente aminoácidos libres. Entre los 20 y 40 días tiene lugar el final de la fermentación y se produce un incremento del contenido de nitrógeno total y una disminución de las proteínas que podría deberse fundamentalmente a la insolubilización que se produce con el aumento del grado alcohólico del vino. Entre los 40 y 90 días tiene lugar un aumento de los aminoácidos en el vino. Este hecho, se debe a la existencia durante

este periodo de actividad proteásica, que fundamentalmente actuaría sobre los péptidos del vino, o bien, podría ser debido a un proceso de exorción pasiva de aminoácidos, que tendría lugar como respuesta fisiológica a una falta de nutrientes. Este proceso tendría lugar en la etapa final de este periodo, más cerca de los 90 días, en los que es muy probable que no haya levaduras viables. Entre los 90 y 180 días se produce un nuevo incremento del nitrógeno total, debido al aporte de aminoácidos y péptidos, por la autólisis de las levaduras. Entre 180 y 270 días siguen aumentando los aminoácidos libres, producto de la autólisis de las levaduras. El incremento de las proteínas en todos los vinos, evidencia la presencia de poros de mayor tamaño en la pared celular de las levaduras, que permiten el paso de estos compuestos al medio. Entre 270 y 365 días se observa un aumento de nitrógeno total. La concentración de proteínas aumenta ligeramente. En cambio, se observa una disminución global de los aminoácidos presentes en el vino. Diferentes autores han señalado como causa de esta disminución las reacciones de descarboxilación y desaminación de los aminoácidos y su participación en la formación de diferentes compuestos (Perin y Llorca, 1974; Feuillat y Charpentier, 1982; Herraiz y col., 1993).

3.5.2 Composición nitrogenada de los vinos espumosos de la variedad Parellada procedentes de uvas de viñas sometidas a elevada explotación (vinos PA1 y PA2) y de uvas de viñas cultivadas según las prácticas tradicionales de la zona del cava (PB1 y PB2).

En la **tabla 17**, se muestran los valores de concentración correspondientes a los compuestos nitrogenados estudiados en los vinos espumosos Parellada durante el envejecimiento. Los valores de nitrógeno total, se encuentran comprendidos entre 158,51 y 199, 41 mg/L. En la **figura 30**, se observa la evolución del contenido de nitrógeno durante el envejecimiento. Los vinos PB1, PA1 y PA2, siguen un evolución parecida, experimentando un aumento de concentración entre los 12 y 15 meses. El vino PB2 presenta un evolución diferente, experimentando un fuerte aumento de concentración a partir de los 15 meses, hasta alcanzar 334,21 mg/L, que es el valor de concentración más alto de todos los vinos analizados.

Tabla 17. Concentración de nitrógeno total, aminoácidos libres y proteínas de los vinos espumosos de la variedad Parellada con distintos tiempos de envejecimiento..

Vinos	Tiempo (meses)	Nitrógeno total (mg/L)	Aminoácidos libres (mg Leu/L)	Proteínas (mg BSA/L)
Parellada A1	9	165,4	435,5	3,2
	12	158,4	442,8	4,5
	15	175,6	240,4	5,7
	18	174,5	290,1	5,6
Parellada A2	9	161,2	412,9	8,8
	12	160	364	8,1
	15	178,9	253,5	5,6
	18	178	279,5	4
Parellada B1	9	164,9	373	2,3
	12	163,2	342,2	5,5
	15	178,5	229,3	5,2
	18	182,8	272,2	4
Parellada B2	9	179,1	416,9	3,8
	12	173,1	378,1	5,8
	15	170,5	256,9	4,4
	18	199,4	334,2	4,7

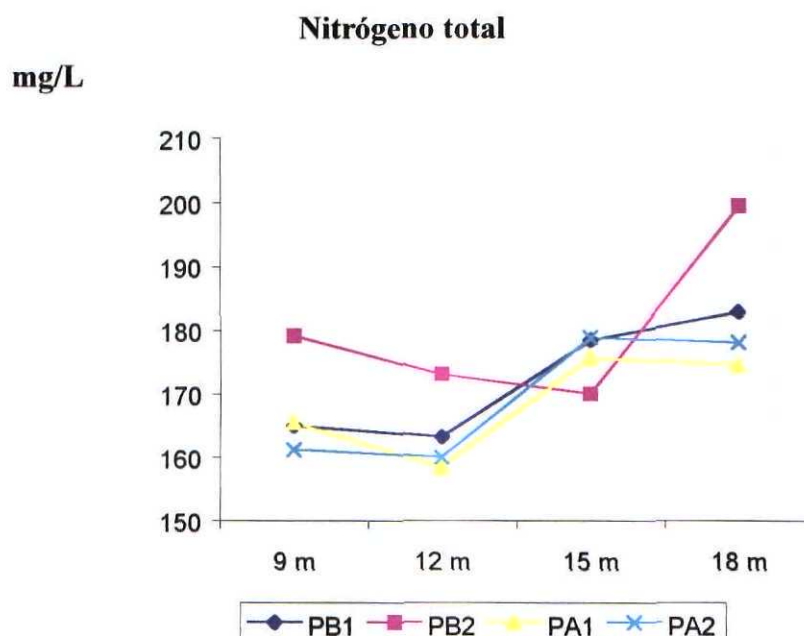


Figura 30. Evolución del contenido de nitrógeno total durante el envejecimiento en los vinos espumosos de la variedad Parellada

La concentración de aminoácidos libres se encuentra comprendida 229,32 y 442,88 mg/L. En la **figura 31**, se puede observar la evolución de estos compuestos durante el envejecimiento. Todos los vinos espumosos estudiados, presentan una evolución similar, se produce una disminución en la concentración hasta los 15 meses de envejecimiento, para experimentar un ligero aumento hasta los 18 meses. Este pequeño aumento, podría deberse a que se está produciendo el proceso de autólisis de las levaduras, y algunas enzimas del interior citoplasmático, fundamentalmente peptidasas, están hidrolizando algunos péptidos del vino, liberando aminoácidos, que se traduce en un aumento en la concentración.

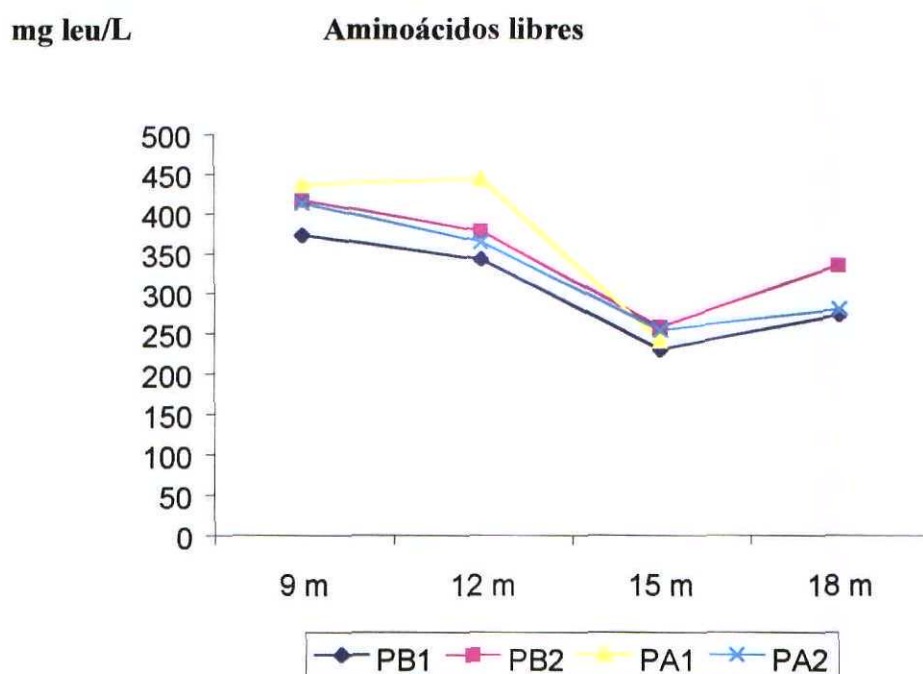


Figura 31. Evolución del contenido de aminoácidos libres durante el envejecimiento de los vinos espumosos de la variedad Parellada.

La concentración de proteínas en estos vinos está comprendida entre 3,22 y 8,87 mg BSA/L. Estos valores podrían considerarse bajos para un vino espumoso, aunque Pueyo (1994), determinó valores de proteínas comprendidos entre 5,7 y 6,8 mg BSA/L en los vinos base monovarietales Parellada que analizó. Los vinos espumosos de 9 y 12 meses A2 tienen una mayor concentración de proteínas que el resto de los vinos.

3.5.3 Composición nitrogenada de los vinos espumosos elaborados con uvas de las variedades tintas Trepát, Monastrell vinificadas en blanco y con uvas de la variedad Garnacha vinificadas en rosado.

En la **tabla 18** se muestran los valores en mg/L, correspondientes a los distintos compuestos nitrogenados analizados en los vinos base y espumosos elaborados con las variedades Trepát y Monastrell de 9, 12, 15 y 18 meses de envejecimiento. Debido a que en los vinos de variedades tintas no se puede determinar el nitrógeno proteico por el método de Bradford debido a la interferencia del color del vino, el nitrógeno proteico más el peptídico, se ha calculado como la diferencia entre la cantidad de nitrógeno total y la del nitrógeno correspondiente a los aminoácidos. En la **tabla 18** se puede comprobar que la concentración de compuestos nitrogenados es mayor en los vinos elaborados con la variedad Trepát que con la variedad Monastrell. En la **figura 32**, se representa la evolución del contenido de nitrógeno amínico en estos vinos. Se puede comprobar que a los 15 meses, la concentración de nitrógeno amínico alcanza los mínimos valores, y a partir de este momento y hasta los 18 meses empieza a aumentar, alcanzando los mayores valores en este periodo. Esto podría estar indicando, que en estos vinos, el comienzo de la autólisis de las levaduras, se produciría aproximadamente a partir de los 15 meses de envejecimiento. La disminución observada en el nitrógeno amínico, durante todo el periodo de envejecimiento podría deberse a la adsorción de este tipo de compuestos a las paredes de las levaduras, esto sería así hasta el inicio de la autólisis, en el que aumentaría la concentración, porque enzimas hidrolíticas actuaran sobre péptidos del vino, por su liberación del interior citoplasmático, o bien por la liberación de las paredes de las levaduras, como se ha descrito que ocurre en otro tipo de compuestos, como algunos compuestos fenólicos, que aumentan como consecuencia de la autólisis, al liberarse de las paredes a las que estaban adsorbidos (Ibern-Gómez y col, 2000). También se ha descrito (Martínez-Rodríguez, 2000), la posibilidad de que estos compuestos experimenten reacciones de decarboxilación y desaminación para formar otros compuestos.

Tabla 18. Concentración de nitrógeno total, aminoácidos libres y proteínas de los vinos base y los vinos espumosos elaborados con las variedades tintas Trepát y Monastrell.

Vinos	Tiempo (meses)	Nitrógeno total (mg/L)	Nitrógeno amínico (mg/L)	Nitrógeno proteico + Nitrógeno peptídico (mg/L)
Trepát 1	V base	141,6	29,3	112,3
	V esp:			
	9	129,5	30,3	99,1
	12	125,7	26	99,6
	15	140,1	19,2	120,8
	18	144,5	23,4	121
Trepát 2	V base	139,4	29,8	109,6
	V esp:			
	9	125,2	30,2	94,9
	12	128,4	28,5	99,9
	15	142,2	14,2	128
	18	143,4	23,6	119,8
Monastrell 1	V base	82	19,2	62,7
	V esp:			
	9	73	18,3	54,7
	12	76,7	16,3	60,4
	15	88,5	11,4	77,1
	18	85,9	17,5	68,4
Monastrell 2	V base	60,3	13,2	47
	V esp:			
	9	64,4	16,7	47,6
	12	62,1	13,6	48,5
	15	68,5	8,6	59,8
	18	70	8,6	58,1

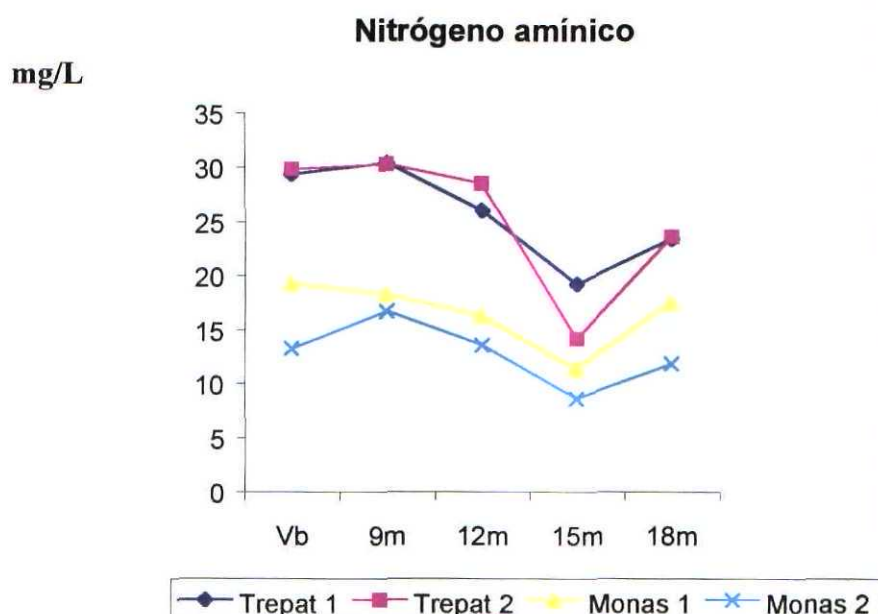


Figura 32. Concentración de nitrógeno amínico de los vinos base elaborados con la variedad Trepat y Monastrell y evolución durante el envejecimiento de los vinos espumosos.

En la **tabla 19**, se muestran los valores de los compuestos nitrogenados correspondientes al vino base y a los vinos espumosos de 9 y 12 meses de envejecimiento elaborados con la variedad Garnacha. La composición nitrogenada de estos vinos es análoga a la de los vinos de la variedad Trepat.

Tabla 19. Concentración de nitrógeno total, aminoácidos libres y nitrógeno proteico más peptídico del vino base y de los vinos espumosos elaborados con la variedad Garnacha.

Tiempo (meses)	Nitrógeno total (mg/L)	Nitrógeno amínico (mg/L)	Nitrógeno amínico + Nitrógeno peptídico (mg/L)
V base	140,5	16	134
9 m	139,9	13,9	116,9
12 m	144	10,5	133,4

3.5.4 Composición nitrogenada del vino base y los vinos espumosos denominados *Tipus* y de los vinos de mezcla.

En la **tabla 20**, se muestran los valores de la concentración en mg/L de los distintos compuestos nitrogenados analizados en el vino *Tipus*, y en los vinos de mezcla. De nuevo se observa, en el vino *Tipus*, al igual que en los vinos anteriormente analizados, una disminución del nitrógeno total durante los primeros meses de envejecimiento, y un aumento a partir de los 12 meses, igual que le ocurre al nitrógeno proteico y peptídico, en el que se alcanzan los máximos valores a los 15 meses. El nitrógeno amínico, al contrario disminuye durante todo el envejecimiento, por lo que el aumento de nitrógeno total que se observa se debe al aumento de nitrógeno peptídico y proteico, pero no debido a los aminoácidos. La disminución del nitrógeno amínico se produce hasta los 15 meses, a partir de aquí experimenta un aumento, que coincide además con los valores más altos de nitrógeno proteico y peptídico. Este aumento en el nitrógeno amínico puede ser indicativo de que se está produciendo la autólisis en estos vinos. En los vinos de mezcla, la tendencia que se observa en este grupo de compuestos durante el envejecimiento es la misma que en el resto de los vinos estudiados, como se puede comprobar en la figura 33, se produce una disminución del nitrógeno amínico hasta los 15 meses, y a partir de este momento se incrementa de nuevo la concentración, coincidiendo posiblemente con el inicio de la autólisis.

Tabla 20. Concentración de nitrógeno total, aminoácidos libres y nitrógeno proteico más peptídico del vino base y espumosos Tipus, así como de los vinos espumosos elaborados con mezclas de este.

Vinos	Tiempo (meses)	Nitrógeno total (mg/L)	Nitrógeno amínico (mg/L)	Nitrógeno proteico + Nitrógeno peptídico (mg/L)
Tipus	V base	164,5	36,5	127,9
	V esp:			
	9	133,3	28,4	104,9
	12	149,6	31,4	118,2
	15	158,2	15,3	142,9
	18	159,7	22,5	137,1
Trepat 1 50%	V esp:			
	9	137,2	31,7	105,3
	12	131,1	24,8	106,3
	15	148,2	17,2	130,9
	18	151,2	19	132,1
Trepat 2 50%	V esp:			
	9	137,2	29,1	108
	12	131,1	25,1	105,9
	15	147,3	13,6	133,7
	18	149,2	19,9	129,3
Monastrell 1 25%	V esp:			
	9	118,2	24,2	93,9
	12	125,3	23,4	101,9
	15	137,9	15,2	122,6
	18	138,3	19,8	118,5
Monastrell 1 25%	V esp:			
	9	125,7	24	92,4
	12	133,3	22,8	102,9
	15	136,1	15,2	118,1
	18	136,8	17,1	119,0

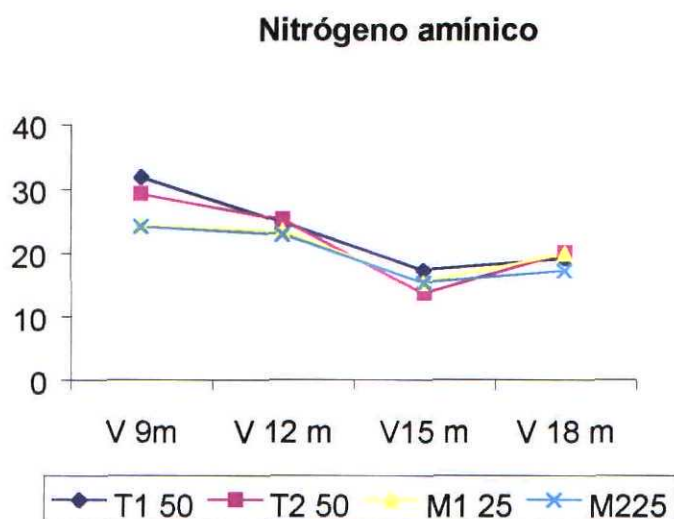


Figura 33.Concentración de nitrógeno amínico de los vinos espumosos elaborados con mezclas del Vino Tipus y los vinos Trepát y Monastrell, y evolución durante el envejecimiento.

3.6 Compuestos volátiles en vinos base y en vinos espumosos

3.6.1 Concentración de los compuestos volátiles en los vinos base

En las **tablas** de la **21** a la **32**, se muestran los resultados de concentración obtenidos del análisis de todos los compuestos volátiles, tanto por inyección directa como con etapa previa de extracción y concentración, en los vinos base y en los vinos espumosos estudiados.

Tabla 21. Concentración de ésteres (mg/L) en el vino base, y en los vinos espumosos elaborados con las distintas cepas de levadura y sin adición de bentonita.

ESTERES						
	Acetato de etilo	Acetato de isobutilo	Acetato de butilo	Acetato de isopentilo	Acetato de hexilo	Suma de acetatos
Vino base	34,43	n.d.	n.d.	1,05	0,15	35,63
Vinos espumosos:						
Cepa EC1118						
20	19,15	n.d.	n.d.	0,62	0,12	19,89
40	35,51	n.d.	n.d.	1,09	0,13	36,73
90	40,26	n.d.	n.d.	0,99	0,13	41,38
180	35,21	n.d.	n.d.	0,54	0,10	35,85
270	29,52	n.d.	n.d.	0,36	0,09	29,97
365	21,85	n.d.	n.d.	0,48	n.d.	22,33
Cepa IFI-473						
20	25,85	n.d.	n.d.	0,63	0,11	26,59
40	28,41	n.d.	n.d.	0,78	0,12	29,31
90	36,43	n.d.	n.d.	1,11	0,13	37,67
180	26,80	n.d.	n.d.	0,54	0,10	27,44
270	30,62	n.d.	n.d.	0,42	0,09	31,13
365	26,70	n.d.	n.d.	0,51	0,01	27,22
Cepa IFI-475						
20	24,39	n.d.	n.d.	0,61	0,11	25,11
40	35,32	n.d.	n.d.	0,79	0,12	36,23
90	33,65	n.d.	n.d.	1,18	0,13	34,96
180	23,65	n.d.	n.d.	0,58	0,10	24,33
270	32,81	n.d.	n.d.	0,43	0,09	33,33
365	24,57	n.d.	n.d.	0,51	n.d.	25,08
Cepa P-29						
20	24,07	n.d.	n.d.	0,79	0,12	24,98
40	36,30	n.d.	n.d.	0,65	0,11	37,06
90	42,97	n.d.	n.d.	1,01	0,13	44,11
180	20,63	n.d.	n.d.	0,44	0,10	21,17
270	29,46	n.d.	n.d.	0,35	0,09	29,90
365	33,17	n.d.	n.d.	0,52	n.d.	33,69
Cepa J						
20	26,86	n.d.	n.d.	0,63	0,12	27,61
40	28,82	n.d.	n.d.	0,77	0,11	29,70
90	28,43	n.d.	n.d.	0,88	0,11	29,42
180	22,89	n.d.	n.d.	0,54	0,10	23,53
270	26,72	n.d.	n.d.	0,31	0,09	27,12
365	29,51	n.d.	n.d.	0,46	0,02	29,99

Tabla 21. (Continuación).

ESTERES					
	Butano de etilo	Octanoato de etilo	Decanoato de etilo	Succinato de dietilo	Suma de ésteres etílicos
Vino base	0,22	1,47	0,52	1,15	3,36
Vinos espumosos:					
Cepa EC1118					
20	0,13	1,30	0,22	4,56	6,21
40	0,25	1,80	0,48	4,60	7,13
90	0,23	1,39	0,13	2,23	3,98
180	0,27	0,87	n.d.	2,56	3,70
270	0,28	0,23	n.d.	1,94	2,45
365	n.d.	0,18	0,10	2,00	2,28
Cepa IFI-473					
20	0,12	1,37	0,42	2,37	4,28
40	0,15	1,44	0,23	0,78	2,60
90	0,30	1,40	0,05	0,19	1,94
180	0,27	0,90	0,00	0,16	1,33
270	0,30	0,25	0,00	1,97	2,52
365	0,00	0,16	0,09	1,25	1,50
Cepa IFI-475					
20	0,15	1,27	0,30	2,45	4,17
40	0,20	1,37	0,14	1,85	3,56
90	0,35	1,54	0,15	0,43	2,47
180	0,30	1,00	n.d.	0,53	1,83
270	0,32	0,20	n.d.	1,39	1,91
365	n.d.	0,12	0,02	1,22	1,36
Cepa P-29					
20	0,18	1,49	0,45	4,38	6,50
40	0,17	0,96	n.d.	2,39	3,52
90	0,28	1,24	n.d.	0,19	1,71
180	0,24	0,86	n.d.	0,65	1,75
270	0,23	0,19	n.d.	2,01	2,43
365	n.d.	0,19	0,01	1,43	1,63
Cepa J					
20	0,11	1,43	0,22	2,25	4,01
40	0,18	0,29	n.d.	0,18	0,65
90	0,26	0,37	n.d.	0,37	1,00
180	0,27	1,05	n.d.	0,84	2,16
270	0,24	0,18	n.d.	1,89	2,31
365	n.d.	0,34	0,06	1,85	2,25

Tabla 22. Concentración de alcoholes (mg/L) en el vino base y en los vinos espumosos elaborados con las distintas cepas de levaduras, y sin adición de bentonita.

ALCOHOLES							
	1-Propanol	Isobutanol	2+3-metil- 1-butanol	Suma alch, superiores	Metanol	1-hexanol	Cis-3- hexen-1-ol
Vino base	25,36	14,58	103,66	143,60	24,70	1,07	n.d.
Vinos espumosos:							
Cepa EC1118							
20	32,82	18,35	127,54	178,71	35,08	1,06	n.d.
40	39,84	19,47	153,03	212,34	39,42	1,01	n.d.
90	40,74	21,37	149,50	211,61	31,88	1,15	n.d.
180	33,75	19,84	146,90	200,49	28,72	1,32	n.d.
270	35,00	19,03	145,01	199,04	25,57	1,54	n.d.
365	31,09	14,05	136,39	181,53	43,83	0,63	n.d.
Cepa IFI-473							
20	34,55	17,81	141,99	194,35	34,91	1,00	n.d.
40	34,28	19,93	139,42	193,63	30,37	1,05	n.d.
90	30,71	18,05	136,71	185,47	18,85	1,23	n.d.
180	37,33	20,17	149,88	207,38	33,82	1,33	n.d.
270	36,41	20,72	151,02	208,15	30,08	1,60	n.d.
365	33,58	17,22	148,12	198,92	35,87	0,55	n.d.
Cepa IFI-475							
20	35,84	20,17	141,98	197,99	28,50	1,14	n.d.
40	39,49	23,72	156,68	219,89	36,08	1,09	n.d.
90	34,21	19,38	149,97	203,56	37,16	1,39	n.d.
180	34,17	19,39	138,06	191,62	23,38	1,47	n.d.
270	37,06	21,76	155,62	214,44	33,87	1,43	n.d.
365	35,11	17,39	146,72	199,22	42,50	0,74	n.d.
Cepa P-29							
20	32,83	17,48	128,93	179,24	28,74	1,11	n.d.
40	39,48	21,71	153,52	214,71	31,42	1,01	n.d.
90	39,11	20,38	159,29	218,78	32,25	1,08	n.d.
180	36,82	16,81	142,57	196,20	28,38	1,37	n.d.
270	39,25	20,24	153,97	213,46	43,15	1,52	n.d.
365	39,64	17,92	163,51	221,07	47,92	0,82	n.d.
Cepa J							
20	33,11	19,60	138,47	191,18	31,87	1,05	n.d.
40	32,98	17,93	130,71	181,62	28,28	1,17	n.d.
90	31,94	18,28	126,71	176,93	23,23	1,16	n.d.
180	34,56	19,78	154,01	208,35	29,56	1,50	n.d.
270	33,98	18,76	138,05	190,79	33,58	1,60	n.d.
365	41,37	19,80	160,64	221,81	48,22	0,76	n.d.

Tabla 23. Concentración de ácidos grasos (mg/L) y otros compuestos volátiles en el vino base, y en los vinos espumosos elaborados con las diferentes cepas de levaduras, y sin adición de bentonita.

	ACIDOS GRASOS				OTROS COMPUESTOS		
	Acido hexanoico	Acido octanoico	Acido decanoico	Suma de ácidos grasos	Acetal-dehído	γ -butiro lactona	$T_R=35,5$
Vino base	7,65	4,95	2,06	14,66	36,37	n.d.	0,13
Vinos espumosos							
Cepa EC1118							
20	7,48	4,60	1,46	13,54	60,44	n.d.	0,24
40	7,20	4,60	1,56	13,36	72,50	n.d.	0,15
90	7,85	4,98	1,39	14,22	75,70	n.d.	0,18
180	9,93	4,91	0,95	15,79	50,00	n.d.	0,17
270	9,07	6,08	0,57	15,72	52,49	n.d.	0,28
365	9,76	4,15	0,41	14,32	31,03	n.d.	0,10
Cepa IFI-473							
20	7,45	4,49	1,44	13,38	67,06	n.d.	0,17
40	7,94	5,26	1,59	14,79	58,68	n.d.	0,20
90	8,02	4,84	1,24	14,10	52,49	n.d.	0,24
180	7,81	4,67	1,09	13,57	56,84	n.d.	0,18
270	9,19	6,20	0,54	15,93	59,75	n.d.	0,27
365	8,77	2,64	0,47	11,88	28,66	n.d.	0,06
Cepa IFI-475							
20	8,67	6,19	1,86	16,72	60,32	n.d.	0,24
40	7,74	4,46	1,27	13,47	69,71	n.d.	0,24
90	9,08	6,80	1,80	17,68	63,60	n.d.	0,22
180	8,87	6,77	1,35	16,99	53,40	n.d.	0,24
270	8,06	5,10	0,48	13,64	57,90	n.d.	0,34
365	9,15	2,86	0,08	12,09	31,00	n.d.	0,07
Cepa P-29							
20	8,43	6,14	2,10	16,67	64,31	n.d.	0,23
40	7,10	3,72	1,22	12,04	75,60	n.d.	0,20
90	7,34	4,08	1,05	12,47	71,52	n.d.	0,20
180	8,67	6,66	1,37	16,70	94,16	n.d.	0,27
270	9,14	6,59	0,62	16,35	75,21	n.d.	0,29
365	9,35	2,53	0,40	12,28	33,35	n.d.	0,09
Cepa J							
20	7,51	4,04	1,21	12,76	70,98	n.d.	0,17
40	8,36	5,14	0,51	14,01	71,01	n.d.	0,20
90	7,76	4,77	0,51	13,04	56,49	n.d.	0,20
180	9,12	6,28	1,16	16,56	51,32	n.d.	0,30
270	9,63	6,58	0,54	16,75	51,21	n.d.	0,29
365	10,52	3,73	0,70	14,95	33,02	n.d.	0,09

Tabla 24. Concentración de ésteres (mg/L) en el vino base, y en los vinos espumosos elaborados con las distintas cepas de levadura y con adición de bentonita.

ESTERES						
	Acetato de etilo	Acetato de isobutilo	Acetato de butilo	Acetato de isopentilo	Acetato de hexilo	Suma de acetatos
Vino base	34,43	n.d.	n.d.	1,05	0,15	35,63
Vinos espumosos:						
Cepa EC1118						
20	20,09	n.d.	n.d.	0,85	0,12	21,06
40	21,22	n.d.	n.d.	0,51	0,11	21,84
90	33,40	n.d.	n.d.	1,06	0,13	34,59
180	35,96	n.d.	n.d.	0,56	0,10	36,62
270	27,18	n.d.	n.d.	0,40	0,09	27,67
365	25,38	n.d.	n.d.	0,51	n.d.	25,89
Cepa IFI-473						
20	28,35	n.d.	n.d.	0,57	0,11	29,03
40	27,65	n.d.	n.d.	0,72	0,12	28,49
90	34,84	n.d.	n.d.	0,94	0,12	35,90
180	29,68	n.d.	n.d.	0,45	0,10	30,23
270	24,48	n.d.	n.d.	0,39	0,09	24,96
365	28,26	n.d.	n.d.	0,54	0,01	28,81
Cepa IFI-475						
20	27,14	n.d.	n.d.	0,55	0,11	27,80
40	40,77	n.d.	n.d.	0,98	0,11	41,86
90	38,38	n.d.	n.d.	1,01	0,13	39,52
180	33,41	n.d.	n.d.	0,42	0,10	33,93
270	30,39	n.d.	n.d.	0,36	0,09	30,84
365	24,19	n.d.	n.d.	0,52	n.d.	24,71
Cepa P-29						
20	29,28	n.d.	n.d.	0,66	0,11	30,05
40	39,92	n.d.	n.d.	0,95	0,11	40,98
90	37,95	n.d.	n.d.	1,09	0,13	39,17
180	22,33	n.d.	n.d.	0,39	0,10	22,82
270	32,69	n.d.	n.d.	0,42	0,09	33,20
365	19,26	n.d.	n.d.	0,48	n.d.	19,74
Cepa J						
20	25,26	n.d.	n.d.	0,52	0,11	25,89
40	30,51	n.d.	n.d.	0,90	0,11	31,52
90	31,00	n.d.	n.d.	1,08	0,11	32,19
180	28,39	n.d.	n.d.	0,54	0,10	29,03
270	25,10	n.d.	n.d.	0,39	0,09	25,58
365	29,65	n.d.	n.d.	0,47	n.d.	30,12

Tabla 24. (continuación)

ESTERES					
	Butano de etilo	Octanoato de etilo	Decanoato de etilo	Succinato de dietilo	Suma de ésteres etílicos
Vino base	0,22	1,47	0,52	1,15	3,36
Vinos espumosos:					
Cepa EC1118					
20	0,18	1,06	0,06	2,77	4,04
40	0,12	1,04	0,13	2,96	4,25
90	0,24	1,55	0,10	0,73	2,62
180	0,30	0,83	n.d.	0,77	1,90
270	0,31	0,22	n.d.	0,70	1,23
365	n.d.	1,74	0,38	2,97	5,09
Cepa IFI-473					
20	0,12	1,20	0,18	3,00	4,50
40	0,19	1,38	0,12	1,56	3,25
90	0,27	1,13	n.d.	0,15	1,55
180	0,29	0,75	n.d.	0,22	1,26
270	0,30	0,25	n.d.	1,98	2,53
365	n.d.	0,67	0,11	1,55	2,33
Cepa IFI-475					
20	0,12	0,95	0,07	1,59	2,73
40	0,25	0,37	n.d.	n.d.	0,62
90	0,28	1,48	0,08	0,28	2,12
180	0,23	0,95	n.d.	0,70	1,88
270	0,24	0,24	n.d.	1,59	2,07
365	n.d.	0,04	0,01	1,84	1,89
Cepa P-29					
20	0,17	1,00	0,06	2,56	3,79
40	0,23	0,39	n.d.	4,78	5,40
90	0,31	1,38	0,07	0,35	2,11
180	0,21	0,41	n.d.	0,01	0,63
270	0,32	0,20	n.d.	1,90	2,42
365	n.d.	0,38	0,07	2,82	3,27
Cepa J					
20	0,13	0,98	0,01	3,34	4,46
40	0,20	0,39	n.d.	0,11	0,70
90	0,31	0,35	0,01	0,01	0,68
180	0,28	0,92	n.d.	0,80	2,00
270	0,27	0,20	n.d.	2,10	2,57
365	n.d.	0,27	0,01	1,42	1,70

Tabla 25. Concentración de alcoholes (mg/L) en el vino base y en los vinos espumosos elaborados con las distintas cepas de levaduras, y con adición de bentonita.

ALCOHOLES							
	1-Propanol	Isobutanol	2+3-metil- 1-butanol	Suma alch. superiores	Metanol	1-hexanol	Cis-3- hexen-1-ol
Vino base	25,36	14,58	103,66	143,6	24,70	1,07	n.d.
Vinos espumosos:							
Cepa EC1118							
20	28,34	14,68	110,44	153,46	24,71	1,21	n.d.
40	36,78	20,12	145,81	202,71	29,02	1,07	n.d.
90	41,52	25,38	150,28	217,18	33,07	1,18	n.d.
180	36,55	19,34	151,49	207,38	29,72	1,36	n.d.
270	34,29	18,72	134,52	187,53	36,10	1,45	n.d.
365	37,32	17,06	141,16	195,54	40,52	0,59	n.d.
Cepa IFI-473							
20	35,30	20,15	146,23	201,68	38,72	1,09	n.d.
40	34,35	17,95	134,35	186,65	28,84	1,08	n.d.
90	36,92	22,02	154,87	213,81	22,60	1,28	n.d.
180	35,10	20,64	144,49	200,23	23,38	1,45	n.d.
270	32,56	19,02	131,05	182,63	26,71	1,49	n.d.
365	35,62	16,82	145,28	197,72	43,36	0,86	n.d.
Cepa IFI-475							
20	34,95	20,81	149,67	204,43	36,50	1,10	n.d.
40	37,47	20,85	153,10	211,42	34,38	1,08	n.d.
90	33,73	20,78	146,38	200,89	28,41	1,21	n.d.
180	36,91	22,03	162,64	221,58	27,10	1,38	n.d.
270	34,65	18,02	143,97	196,64	35,06	1,42	n.d.
365	35,34	17,04	142,50	194,88	37,73	0,93	n.d.
Cepa P-29							
20	39,98	22,87	151,68	214,53	31,08	1,04	n.d.
40	36,92	22,43	153,16	212,51	25,14	1,13	n.d.
90	33,77	20,00	142,42	196,19	23,36	1,26	n.d.
180	24,20	12,51	93,92	130,63	12,33	1,33	n.d.
270	36,21	20,23	151,42	207,86	33,63	1,56	n.d.
365	33,25	14,36	129,52	177,13	35,45	0,50	n.d.
Cepa J							
20	35,54	17,30	142,48	195,32	24,64	1,11	n.d.
40	35,01	18,77	137,86	191,64	28,43	1,14	n.d.
90	34,30	18,65	135,14	188,09	24,18	1,26	n.d.
180	34,53	18,61	140,86	194,00	24,29	1,49	n.d.
270	29,12	16,57	119,09	164,78	28,79	1,71	n.d.
365	43,35	19,82	147,92	211,09	56,99	0,82	n.d.

Tabla 26. Concentración de ácidos grasos (mg/L) y otros compuestos volátiles en el vino base, y en los vinos espumosos fermentados con las distintas cepas de levaduras y con adición de bentonita.

	ÁCIDOS			OTROS COMPUESTOS		
	Acido hexanoico	Acido octanoico	Acido decanoico	Suma de ácidos grasos	Acetaldehído	γ-butirolactona
Vino base	7,65	4,95	2,06	14,66	36,37	n.d.
Vinos espumosos						
Cepa EC1118						
20	7,89	5,32	1,54	14,75	46,09	n.d.
40	7,98	5,13	1,29	14,40	65,54	n.d.
90	8,21	5,25	1,20	14,66	80,18	n.d.
180	10,25	5,70	1,28	17,23	57,33	n.d.
270	8,63	5,42	0,57	14,62	47,54	n.d.
365	9,48	5,80	1,75	17,03	35,34	n.d.
Cepa IFI-473						
20	6,96	4,74	1,47	13,17	72,07	n.d.
40	7,63	4,61	1,48	13,72	73,05	n.d.
90	8,88	6,15	1,65	16,68	50,50	n.d.
180	8,45	5,28	1,05	14,78	72,71	n.d.
270	8,88	6,24	0,53	15,65	47,70	n.d.
365	9,80	4,83	0,63	15,26	30,82	n.d.
Cepa IFI-475						
20	9,09	4,98	1,11	15,18	69,19	n.d.
40	7,25	3,33	0,39	10,97	69,96	n.d.
90	8,52	5,44	1,20	15,16	49,30	n.d.
180	8,57	6,87	1,58	17,02	56,84	n.d.
270	8,56	5,13	0,55	14,24	51,95	n.d.
365	9,89	2,50	0,08	12,47	28,58	n.d.
Cepa P-29						
20	7,77	4,48	1,21	13,46	78,08	n.d.
40	8,42	5,23	0,51	14,16	69,55	n.d.
90	8,33	5,41	1,36	15,10	59,18	n.d.
180	8,01	6,59	2,01	16,61	33,38	n.d.
270	8,95	6,06	0,55	15,56	59,06	n.d.
365	9,75	6,12	0,46	16,33	25,12	n.d.
Cepa J						
20	7,63	4,45	1,14	13,22	67,98	n.d.
40	8,02	4,99	0,53	13,54	57,94	n.d.
90	8,01	5,30	0,51	13,82	61,05	n.d.
180	8,41	5,53	1,04	14,98	55,16	n.d.
270	9,44	7,04	0,58	17,06	46,51	n.d.
365	10,00	2,37	0,05	12,42	33,52	n.d.

Tabla 27. Concentración de ésteres (mg/L) en los vinos espumosos Parellada.

ESTERES					
Vinos espumosos:	Acetato de etilo	Acetato de isobutilo	Acetato de butilo	Acetato de isopentilo	Acetato de hexilo
PB1					
9 m	19,83	n.d.	n.d.	0,38	0,04
12 m	21,18	n.d.	n.d.	0,36	0,03
15 m	18,92	n.d.	n.d.	0,55	0,07
18 m	25,88	n.d.	n.d.	0,60	0,04
PB2					
9 m	22,43	n.d.	n.d.	0,61	0,04
12 m	21,56	n.d.	n.d.	0,31	0,03
15 m	23,28	n.d.	n.d.	0,26	0,02
18 m	24,22	n.d.	n.d.	0,23	0,019
PA1					
9 m	12,86	n.d.	n.d.	0,19	0,01
12 m	46,37	n.d.	n.d.	0,18	0,01
15 m	49,65	n.d.	n.d.	0,22	0,009
18 m	54,91	n.d.	n.d.	0,33	0,007
PA2					
9 m	25,10	n.d.	n.d.	0,10	0,01
12 m	47,95	n.d.	n.d.	0,15	0,01
15 m	46,10	n.d.	n.d.	0,09	0,007
18 m	52,00	n.d.	n.d.	0,05	0,005

Tabla 27. (Continuación)

ESTERES						
	Butanoato de etilo	Hexanoato de etilo	Octanoato de etilo	Decanoato de etilo	Succinato de dietilo	Lactato de etilo
Vinos espumosos						
	Parellada B1					
9 m	0,23	0,60	1,63	0,67	14,42	27,44
12 m	0,64	0,75	1,15	0,59	18,9	45,04
15 m	0,49	1,29	1,91	0,34	7,58	29,92
18 m	0,68	0,80	1,27	0,23	8,40	84,08
	Parellada B2					
9 m	0,41	1,33	0,47	0,12	6,18	24,98
12 m	0,39	1,11	0,29	0,08	12,95	25,52
15 m	0,41	1,48	0,16	0,03	4,74	32,29
18 m	0,24	1,32	0,16	0,03	5,72	43,79
	Parellada A1					
9 m	0,13	0,68	1,26	0,38	8,18	133,32
12 m	0,08	0,73	0,85	0,24	13,08	153,23
15 m	0,30	0,93	0,49	0,15	3,65	161,89
18 m	0,49	1,12	0,48	0,10	4,10	150,05
	Parellada A2					
9 m	0,28	0,65	1,23	0,39	18,15	95,86
12 m	0,00	1,18	1,30	0,39	18,23	110,29
15 m	0,00	0,74	0,98	0,26	8,79	157,74
18 m	0,00	0,73	0,80	0,17	3,44	118,83

Tabla 28. Concentración de alcoholes (mg/L) en los vinos espumosos Parellada

Vinos espumosos:	ALCOHOLES						
	1-Propanol	Isobutanol	2-metil-1- butanol	3-metil-1- butanol	Metanol	1-hexanol	Cis-3- hexen-1-ol
Parellada B1							
9 m	17,38	24,55	22,77	129,50	28,55	0,577	0,58
12 m	19,37	26,54	26,81	138,09	23,50	0,73	0,44
15 m	18,85	26,20	26,79	140,23	27,56	1,66	0,62
18 m	21,62	26,38	13,87	61,21	41,48	2,15	1,18
Parellada B2							
9 m	16,45	26,11	24,43	143,66	33,85	2,14	1,72
12 m	18,24	26,13	27,18	142,78	25,23	2,26	2,09
15 m	16,71	28,08	31,45	151,41	28,34	2,32	1,60
18 m	23,26	30,26	26,16	132,40	31,24	2,14	1,20
Parellada A1							
9 m	24,35	52,98	19,83	99,20	38,87	0,68	0,63
12 m	27,05	60,66	22,64	111,22	39,31	0,80	0,71
15 m	26,27	66,04	24,81	117,52	42,82	1,82	0,65
18 m	32,57	69,83	20,21	105,47	45,85	1,96	0,65
Parellada A2							
9 m	23,19	57,56	22,94	106,93	32,60	0,58	0,15
12 m	23,51	62,34	23,5	111,85	33,25	0,86	0,16
15 m	25,14	63,05	24,75	110,88	47,73	0,64	0,13
18 m	25,90	61,54	18,46	104,87	40,82	0,62	0,31

Tabla 29. Concentración de ácidos grasos y otros compuestos volátiles (mg/L) en los vinos espumosos Parellada.

	ÁCIDOS GRASOS			OTROS COMPUESTOS	
	Acido hexanoico	Acido octanoico	Acido decanoico	Acetaldehído	γ-Butirolactona
Vinos espumosos:					
	Parellada B1				
9 m	3,94	12,54	1,98	39,44	n.d.
12 m	9,16	22,82	2,74	65,17	n.d.
15 m	7,60	8,58	1,33	76,79	n.d.
18 m	13,49	12,93	3,01	53,80	n.d.
	Parellada B2				
9 m	6,65	9,27	2,34	69,32	n.d.
12 m	17,46	14,23	4,55	71,86	n.d.
15 m	6,70	9,21	1,62	86,11	n.d.
18 m	12,13	10,38	1,97	92,91	n.d.
	Parellada A1				
9 m	2,28	4,85	0,86	36,41	n.d.
12 m	3,13	6,08	1,06	36,66	n.d.
15 m	5,10	9,58	1,27	37,70	n.d.
18 m	4,64	12,73	1,15	44,27	n.d.
	Parellada A2				
9 m	4,27	9,09	1,16	32,89	n.d.
12 m	4,53	12,38	1,43	51,87	n.d.
15 m	5,03	13,06	1,43	38,57	n.d.
18 m	1,79	16,65	1,02	50,29	n.d.

Tabla 30. Concentración de ésteres (mg/L) en los vinos base y espumosos elaborados con las variedades de uvas tintas Trepát, Monastrell y Garnacha.

ESTERES					
Vinos	Acetato de etilo	Acetato de isobutilo	Acetato de butilo	Acetato de isopentilo	Acetato de hexilo
Trepát 1					
Vino base	49,77	n.d.	n.d.	1,68	0,14
9 m	50,50	n.d.	n.d.	0,63	0,012
12 m	49,77	n.d.	n.d.	0,63	0,014
15 m	59,27	n.d.	n.d.	0,10	0,003
18 m	67,60	n.d.	n.d.	0,08	0,002
Trepát 2					
Vino base	52,38	n.d.	n.d.	1,41	0,08
9 m	28,18	n.d.	n.d.	0,68	0,016
12 m	52,38	n.d.	n.d.	0,25	0,007
15 m	59,92	n.d.	n.d.	0,22	0,005
18 m	58,03	n.d.	n.d.	0,19	0,004
Monastrell 1					
Vino base	49,91	n.d.	n.d.	0,22	0,004
9 m	46,59	n.d.	n.d.	0,12	0,002
12 m	49,91	n.d.	n.d.	0,14	0,002
15 m	69,61	n.d.	n.d.	0,13	0,002
18 m	76,13	n.d.	n.d.	0,11	0,001
Monastrell 2					
Vino base	33,32	n.d.	n.d.	0,26	n.d.
9 m	61,92	n.d.	n.d.	0,16	n.d.
12 m	33,32	n.d.	n.d.	0,16	n.d.
15 m	83,83	n.d.	n.d.	0,19	n.d.
18 m	84,11	n.d.	n.d.	0,14	0,002
Garnacha					
Vino base	32,37	n.d.	n.d.	2,83	0,88
9 m	37,64	n.d.	n.d.	2,32	0,86
12 m	76,79	n.d.	n.d.	2,57	0,70

Tabla 30. (Continuación)

ESTERES						
Vinos	Butanoato de etilo	Hexanoato de etilo	Octanoato de etilo	Decanoato de etilo	Succinato de dietilo	Lactato de etilo
Trepát 1						
Vino base	0,11	0,98	3,22	1,08	2,46	35,97
9 m	n.d.	1,18	0,53	0,10	7,92	125,20
12 m	n.d.	1,29	1,06	1,06	4,59	119,14
15 m	n.d.	0,28	0,18	0,18	1,84	170,50
18 m	n.d.	0,30	0,21	0,21	1,80	155,74
Trepát 2						
Vino base	0,29	1,15	2,29	1,21	1,68	35,27
9 m	n.d.	1,29	1,16	0,38	8,49	119,98
12 m	0,03	0,35	0,40	0,40	1,30	134,73
15 m	0,09	0,36	0,26	0,26	3,35	173,41
18 m	n.d.	0,42	0,29	0,29	3,12	137,88
Monastrell 1						
Vino base	0,15	0,22	0,25	0,05	3,45	10,51
9 m	0,06	0,22	0,08	0,02	2,31	13,26
12 m	0,09	0,28	0,09	0,09	3,83	15,96
15 m	n.d.	0,28	0,10	0,10	5,37	20,81
18 m	0,01	0,28	0,09	0,09	6,37	31,35
Monastrell 2						
Vino base	0,22	0,32	0,29	0,04	3,22	26,52
9 m	0,01	0,30	0,08	0,02	2,47	71,22
12 m	n.d.	0,22	0,06	0,06	3,52	96,35
15 m	0,04	0,27	0,08	0,08	4,33	114,29
18 m	n.d.	0,23	0,05	0,05	4,16	92,60
Garnacha						
Vino base	1,90	1,82	0,57	0,10	2,65	12,86
9 m	1,90	1,84	0,56	0,08	4,05	26,85
12 m	2,52	1,33	0,94	0,04	2,66	17,84

Tabla 31. Concentración de alcoholes (mg/L) en los vinos base y espumosos elaborados con las variedades de uvas tintas, Trepát, Monastrell y Garnacha.

ALCOHOLES							
Vinos	1-Propanol	Isobutanol	2-metil-1-butanol	3-metil-1-butanol	Metanol	1-hexanol	Cis-3-hexen-1-ol
Trepát 1							
Vino base	12,01	46,01	39,42	196,01	44,05	1,08	0,91
9 m	13,17	39,28	33,24	172,31	36,28	2,03	0,48
12 m	10,57	33,36	32,67	148,95	27,83	1,52	0,62
15 m	12,76	41,69	41,26	182,67	32,83	0,34	0,36
18 m	20,42	43,88	42,61	166,70	41,71	0,34	0,29
Trepát 2							
Vino base	14,65	47,19	39,59	206,50	45,60	1,71	1,51
9 m	12,43	36,16	31,11	162,59	37,94	1,55	0,49
12 m	12,90	39,58	38,80	175,78	36,24	0,62	0,35
15 m	13,32	43,47	42,60	185,24	38,32	1,10	0,32
18 m	19,38	43,28	29,34	146,93	38,33	0,76	0,27
Trepát 3							
Vino base	18,12	32,30	34,03	184,21	47,58	0,57	0,78
9 m	17,65	29,46	30,49	162,07	46,14	0,29	0,31
12 m	17,44	28,58	34,81	159,29	38,07	0,24	0,33
15 m	18,82	34,37	43,66	181,81	43,42	0,44	0,37
18 m	24,00	37,41	35,10	175,00	40,23	0,47	0,24
Trepát 4							
Vino base	19,09	23,64	47,84	172,63	53,07	0,83	0,29
9 m	18,73	24,56	36,98	156,11	45,28	0,61	0,21
12 m	21,80	30,32	49,22	185,45	63,25	0,95	0,17
15 m	21,69	30,19	55,03	186,53	53,08	0,98	0,38
18 m	23,58	33,39	44,78	147,86	59,21	0,68	0,36
Garnacha							
Vino base	16,93	16,95	18,69	103,70	15,27	2,24	n.d.
9 m	26,04	19,18	22,21	123,27	16,20	2,23	n.d.
12 m	15,20	17,38	22,38	124,22	25,33	1,80	n.d.

Tabla 32. Concentración de ácidos grasos y otros compuestos volátiles (mg/L) en los vinos base y espumosos elaborados con las variedades de uvas tintas Trepát, Monastrell y Garnacha.

ÁCIDOS GRASOS				OTROS COMPUESTOS	
Vinos	Acido hexanoico	Acido octanoico	Acido decanoico	Acetaldehído	γ-Butirolactona
Trepát 1					
Vino base	6,81	6,81	2,59	24,05	n.d.
9 m	8,88	15,69	1,82	41,76	n.d.
12 m	7,16	11,37	1,47	29,12	n.d.
15 m	1,19	2,32	0,69	36,62	n.d.
18 m	1,22	2,06	0,52	42,82	n.d.
Trepát 2					
Vino base	8,44	12,96	2,12	30,46	n.d.
9 m	4,94	7,05	1,05	33,19	n.d.
12 m	1,91	2,31	0,58	37,57	n.d.
15 m	3,52	4,27	0,71	41,23	n.d.
18 m	2,65	3,45	0,65	42,81	n.d.
Monastrell 1					
Vino base	3,24	1,73	1,68	144,00	n.d.
9 m	0,61	0,37	0,34	99,93	n.d.
12 m	1,22	0,60	0,35	86,96	n.d.
15 m	1,23	0,95	0,32	100,18	n.d.
18 m	1,30	0,91	0,45	102,30	n.d.
Monastrell 2					
Vino base	5,00	1,15	2,29	83,77	n.d.
9 m	1,10	0,78	0,39	71,66	n.d.
12 m	1,72	0,71	1,14	72,47	n.d.
15 m	1,09	0,81	0,90	80,17	n.d.
18 m	0,58	0,60	0,80	75,24	n.d.
Garnacha					
Vino base	5,33	6,17	1,05	52,05	n.d.
9 m	4,35	5,45	0,69	11,90	n.d.
12 m	4,92	1,70	0,79	16,11	n.d.

3.6.1.1 Ésteres

La concentración de los distintos ésteres analizados tanto en los vinos elaborados con variedades blancas como en los vinos elaborados con variedades tintas vinificadas en blanco, se encuentran en el rango que otros autores (De la Presa-Owens, 1995; Puig-Deu y col., 1999), han determinado en vinos base elaborados con uvas de variedades blancas. En los vinos en los que se ha producido la fermentación maloláctica el acetato y el lactato de etilo son los ésteres mayoritarios. La concentración de acetato de etilo oscila entre 33 y 53 mg/L y el lactato entre 10 y 36 mg/L. En concentraciones mucho menores, inferiores a 4 mg/L se encuentran los acetatos de isopentilo y de hexilo, y los ésteres etílicos de los ácidos grasos, butanoato, octanoato y decanoato de etilo. También se ha detectado el succinato de dietilo con una concentración entre 1,15 y 3,45 mg/L, un poco mayor que la encontrada por Dizy (1993) entre 0,4 y 0,8 mg/L, en vinos de la variedad Malvar, y menor que la encontrada por Mateo y col. (1991), 5 mg/L, en vinos elaborados con la variedad Monastrell. No se han detectado en ningún vino ni el acetato de butilo ni el de isobutilo.

El vino base elaborado con la variedad Garnacha tiene una concentración mayor de casi todos los compuestos volátiles analizados, que los vinos de las otras variedades estudiadas. La maceración con los hollejos que se realiza en la elaboración de estos vinos, influye en gran medida en la concentración de muchos de los compuestos volátiles analizados. Según Piraci y col. (1987), la fermentación a baja temperatura, y el corto la maceración con los hollejos de los vinos rosados da lugar a vinos más aromáticos y frutales por el aumento de ésteres y de ácidos grasos.

Los ésteres butanoato y hexanoato de etilo, así como los acetatos de isopentilo y de hexilo están en concentraciones mucho mayores en el vino base elaborado con la variedad Garnacha que en los otros vinos. Por ejemplo, el vino base de la variedad Garnacha tiene 1,9 mg/L de butanoato de etilo, que es aproximadamente 17 veces más que la cantidad de este compuesto encontrada en los vinos Trepát y Monastrell. El hexanoato de etilo está en una concentración en el vino base Garnacha de 1,82 mg/L, que es 1,8 veces mayor que la encontrada en los vinos base Trepát, y aproximadamente 7 veces mayor que la determinada en los vinos base Monastrell. El acetato de isopentilo,

con una concentración de 0,88 mg/L, también es 1,8 veces mayor que en los vinos base Trepát, y alrededor de 14 veces mayor que en los vinos Monastrell. Por último, el acetato de hexilo, también se ha encontrado en estos vinos en concentraciones apreciables, de 0,88 mg/L, que representa más de 9 veces las que se ha determinado en los vinos base de Trepát, mientras que en los vinos Monastrell, este compuesto o no se detectó, o se encontró en cantidades traza. Es importante recalcar que estos ésteres, que están en mayor concentración en el vino rosado de la variedad Garnacha, están muy relacionados con los aromas frutales y florales, y por tanto pueden tener un efecto positivo en la calidad final de estos vinos.

Los demás ésteres, octanoato y decanoato de etilo, succinato de dietilo, y acetato de etilo, están en concentraciones similares en el vino base Garnacha, y en los demás vinos base.

3.6.1.2 Alcoholes

Los alcoholes mayoritarios de los vinos base son los alcoholes isoamílicos, seguidos del metanol, isobutanol y 1-propanol. Los vinos base elaborados con la variedad Monastrell, tienen una concentración mayor de isobutanol que el resto. El *cis*-3-hexen-1-ol, se ha encontrado en algunos vinos base en una concentración muy pequeña (0,2 a 1,5 mg/L), e incluso no ha sido detectado en algunos vinos. Pueyo (1994), determinó este alcohol de origen no fermentativo en vinos base, en concentraciones de 0,3 a 2,1 mg/L).

El único alcohol que está en mayor concentración en el vino base de la variedad Garnacha, que en los obtenidos con las otras variedades de uvas tintas, es el 1-hexanol, que tiene una concentración de 2,24 mg/L, casi el doble que la encontrada en los vinos base de las variedades tintas Trepát y Monastrell vinificadas en blanco. González-Raurich y col (1985), indican que entre los compuestos volátiles que están en mayor concentración en los vinos rosados que en los blancos se encuentran el metanol y el 1-hexanol, que pueden proceder de la difusión desde los hollejos. Sin embargo, la concentración de metanol que se ha determinado en el vino base Garnacha, es mucho menor, 15,27 mg/L, que la determinada en los vinos base Trepát y Monastrell. Algunos autores han encontrado concentraciones de metanol en vinos base elaborados con

variedades blancas más elevadas que las que presenta el vino Garnacha, a pesar de haberse vinificado en rosado (De la Presa-Owens, 1995; Puig-Deu y col., 1999). Esto quiere decir que este vino tiene una concentración de metanol anormalmente baja

A pesar de que los vinos Garnacha, se han elaborado con macerando con los hollejos, también presentan los valores más bajos de isobutanol y de los dos alcoholes isoamílicos, 2, y 3-metil-1-butanol. Estos dos compuestos se forman a partir de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina, por tanto la maceración con los hollejos, podría tener como consecuencia una mayor extracción de este tipo de compuestos, sin embargo no se ha observado un aumento en este tipo de compuestos, en los vinos Garnacha. Algunos autores atribuyen una menor concentración de alcoholes superiores, en los vinos procedentes de mostos con menores cantidades de sólidos insolubles (Klingshirny col., 1987). Podría ser que el mosto de partida, estuviera muy clarificado, con lo que parte de estos sólidos se eliminarían, y por tanto, se formaría menor cantidad de este tipo de compuestos.

3.6.1.3 Ácidos grasos

Los ácidos grasos detectados en las condiciones analíticas utilizadas son el hexanoico, octanoico y decanoico. Los ácidos hexanoico y octanoico son los que se encuentran en mayor cantidad, de 3,24 a 8,44 mg/l el ácido hexanoico y de 1,15 a 12,96 el ácido octanoico. Los valores de ácido hexanoico determinados en algunos vinos base, son bastante más altos que los encontrados por Puig-Deu y col. (1999) en vinos base elaborados con uvas de variedades blancas, que se han descrito entre 2,25 y 2,30 mg/L, e incluso que los valores que Fraile y col., (2000) han encontrado en un vino rosado elaborado con uvas de la variedad Monastrell, 1,26 mg/L. Sin embargo, Pueyo (1994) ha encontrado valores de ácido hexanoico de hasta 18,7 mg/L, en vinos base elaborados con uvas de la variedad Parellada.

El vino base rosado de la variedad Garnacha tiene una concentración de ácido hexanoico (5,3 mg/L), similar a la determinada en los vinos base de las variedades Trepát y Monastrell. El ácido octanoico, tiene una concentración de 6,1 mg/L, que estaría dentro del rango determinado para este compuesto en los vinos base Trepát, y más alto que la concentración de los vinos Monastrell. El ácido decanoico (1,05 mg/L),

ha presentado los valores más bajos de todos los vinos base estudiados. Estos valores están dentro del rango encontrado por otros autores en vinos base elaborados con uvas de variedades blancas (Puig-Deu y col, 1999).

3.6.1.4 Otros compuestos volátiles:

El acetaldehído se ha encontrado en los vinos en concentraciones muy variables, entre 24 y 144 mg/L. Este compuesto es uno de los que proceden de la fermentación alcohólica, y en suele encontrarse en un rango muy amplio de concentración pudiendo llegar hasta 300 mg/L o incluso a concentraciones mayores (Schreier, 1979).

En ninguno de los vinos base analizados, se ha detectado la γ -butirolactona. Pueyo (1994), determinó este compuesto en vinos base Parellada, en concentraciones comprendidas entre 6,3 y 15,3 mg/L.

3.6.2 Concentración de los compuestos volátiles en los vinos espumosos.

La **tabla 33**, muestra una relación de los distintos compuestos que han sido determinados por otros autores en vinos espumosos, el rango de concentraciones encontradas, así como los valores máximo y mínimo de todos estos trabajos. El número de compuestos determinados por los diferentes autores es de 35 oscilando entre 16 y 23, dependiendo del trabajo.

En esta tabla se puede comprobar que los compuestos determinados por inyección directa, y normalmente mayoritarios en los vinos, se encuentran comprendidos entre 1,16 mg/L para el 1-propanol, y 430,28 mg/L para el lactato de etilo, que es el compuesto que aparece en mayor concentración en los vinos espumosos estudiados. Los compuestos analizados con etapa previa de extracción y concentración, se encuentran comprendidos entre 0,04 mg/L que es la mínima cantidad encontrada por estos autores para el acetato de isopentilo y el ácido decanoico, y 29,10 mg/L, que es la mayor concentración que corresponde a la γ -butirolactona. Los ácidos hexanoico y octanoico que alcanzan valores de 15,51 y 19,80 mg/L respectivamente, son los que

presentan los valores más altos dentro de los compuestos que normalmente requieren concentrarse antes de su análisis.

El grupo de compuestos que aparece en mayor cantidad son los ésteres, que se encuentran en rangos comprendidos entre 0,02 mg/L que es la mínima cantidad encontrada para el laurato de etilo y el acetato de β -feniletanol, otros compuestos como el lactato de etilo aparecen en una elevada concentración (430 mg/L). El éster que aparece en un rango de concentraciones mas amplio es el lactato de etilo que esta comprendido entre 14 y 430 mg/L.

Los alcoholes aparecen en concentraciones que oscilan entre 0,08 mg/L para el alcohol bencílico, que sólo lo da uno de los autores, hasta los alcoholes isoamílicos (2 y 3-metil-1-butanol) que son los mayoritarios en este tipo de vinos. Las mayores variaciones en la concentración también la presentan los alcoholes isoamílicos que oscilan entre 55 y 184,82 mg/L.

Los ácidos aparecen en general en muy pequeña concentración, entre 0,04 mg/L que es el mínimo valor encontrado por estos autores para el ácido decanoico, y los 18,8 mg/L que es la máxima cantidad encontrada para el ácido octanoico. En general todos los ácidos presentan pocas variaciones.

La concentración obtenida del análisis de los compuestos volátiles en todos los vinos espumosos estudiados, se encuentra dentro del rango de concentraciones determinado por otros autores y que se muestra en la tabla x. Los aspectos más relevantes de los resultados obtenidos en el análisis de estos compuestos se detallan a continuación.

Tabla 33. Compuestos volátiles determinados por distintos autores.

Compuesto	Ref (1) N=4	Ref (2) N=2	Ref (3) N=4	Ref (4) N=20	Ref (5) N=1	Ref (6) N=55, N=88*	Ref (7) N=6	Ref (8) N=6	rango**
ESTERES									
Formiato de etilo	-	-	-	-	-	-	0,00-0,10	-	0,00-0,10
Acetato de etilo	-	-	50,00-77,00	-	56,50	9,00-11,00	54,10-82,40	-	9,00-82,40
Acetato de isobutilo	0,09-0,17	-	0,00-0,05	0,02-0,14	-	0,02-0,55	-	-	0,00-0,55
Acetato de isopentilo	-	0,04-0,04	0,14-0,37	0,06-0,38	0,23	0,03-1,30	0,10-0,50	0,27-4,14	0,04-4,14
Acetato de hexilo	0,07-0,40	-	-	0,00-1,04	-	-	0,00-0,20	0,01-0,23	0,00-0,40
Acetato de β -feniletilo	0,20-0,37	0,32-0,46	-	0,06-0,45	0,04	-	-	0,02-0,32	0,02-0,46
Propionato de etilo	-	-	-	-	-	-	1,00-7,10	-	1,00-7,10
Piruvato de etilo	0,42-2,60	7,84-8,46	0,67-175,0	0,37-4,68	0,36	0,10-4,68	-	0,31-0,42	0,10-8,46
Butirato de etilo	0,39-0,49	0,23-0,25	0,23-0,36	0,21-1,25	0,11	-	-	0,00-0,26	0,00-1,25
Lactato de etilo	19,00-36,8	30,48-39,08	58,50-253,4	27,59-329,6	-	27,59-430,28	90,4-183,4	14,41-65,48	14,41-430,2
Succinato de dietilo	0,51-4,20	10,86-11,11	2,03-7,52	4,84-17,69	4,19	4,05-18,42	0,40-18,7	4,67-6,71	0,40-18,70
Hexanoato de etilo	0,65-1,02	0,54-0,58	0,41-0,77	0,28-1,25	0,88	0,29-4,46	0,40-2,60	1,01-1,03	0,28-4,46
Octanoato de etilo	0,87-1,15	0,53-0,61	0,00-0,13	-	1,10	-	0,10-2,60	0,00-0,47	0,00-2,60
Decanoato de etilo	0,17-0,32	0,05-0,09	-	-	0,22	-	0,20-2,60	0,60-1,42	0,00-2,60
Laurato de etilo	0,02-0,15	-	0,48-1,44	0,00-1,84	-	-	-	-	0,02-1,84
ALCOHOLES									
Metanol	-	-	-	-	23,66	-	7,70-30,40	-	7,70-30,4
1-propanol	-	-	24-28	-	-	12,00-99,00	21,60-33,60	1,16-1,93	1,16-99,00
Butanol	-	-	0,90-1,11	0,30-1,38	-	0,11-1,41	-	0,22-0,34	0,11-1,41
Isobutanol	-	-	-	-	-	-	13,20-28,90	10,64-13,57	10,64-28,90
2-metil-1-propanol	-	-	53,00-71,00	-	-	39,00-148,0	-	-	39,00-148,0
2+3 metil-1-butanol	-	-	93,00-108,0	-	118,4	55,00-244,0	148,3-168,6	128,3-184,8	55,00-184,8
Hexanol	1,77-1,82	0,89-0,90	0,67-2,32	0,82-2,62	1,44	-	2,60-10,30	1,04-1,26	0,67-10,30
Cis-3-hexen-1-ol	-	0,15-0,17	-	0,00-0,36	0,07	-	0,30-1,20	0,03-0,08	0,00-1,20

Tabla 33. (Continuación).

Compuesto	1	2	3	4	5	6	7	8	
Cis-2-hexen-1-ol	-	-	-	0-0,40	-	-	-	-	0,00-0,40
Alc. Bencílico	-	-	-	0,08-0,83	-	-	-	-	0,08-0,83
Alc. β -feniletilo	24,30-26,7	57,16-57,32	12,42-47,72	10,37-50,79	11,09	14,12-125,86	-	10,51-12,66	10,51-125,8
ACIDOS									
Ac. Isobutírico	0,32-0,35	-	-	-	0,78	-	0-6,1	0,4-0,53	0,00-6,1
Ac. Isovalérico	-	-	0,56-0,74	0,51-4,88	0,35	0,30-4,89	-	-	0,30-4,89
Ac. Hexanoico	4,75-5,10	3,71-3,81	3,22-5,19	1,96-8,48	0,45	0,50-15,51	3,8-12,8	4,54-4,81	0,45-15,51
Ac. Octanoico	6,80-7,20	4,18-4,59	-	2,31-8,99	6,30	1,41-17,71	4,8-19,8	2,8-6,49	1,41-19,80
Ac. Decanoico	0,80-1,40	0,48-0,77	3,5-4,00	0,22-0,95	1,55	-	-	0,04-0,36	0,04-4,00
Ac. Butírico	0,65-1,38	0,65-0,77	-	-	1,61	-	-	0,42-0,863	0,42-1,61
OTROS									
γ -butirolactona	6,4-19	8,38-11,25	9,68-13,96	8,11-28,20	5,88	2,24-29,10	5,7-25,3	2,4-5,37	2,40-29,10
Acetaldehído	-	-	62,57-116,1	-	49,86	-	26,9-261,7	-	26,9-261,7
Dietil acetal	-	-	-	-	-	-	1,6-28,6	-	1,60-28,60

Ref (1). Versini y col. (1982).

Ref (2). Usseglio-Tomasset y col. (1983).

Ref (3). Silva y col. (1987).

Ref (4). Colagrande y col. (1990).

Ref (5). Cavazza y col. (1990).

Ref (6). Mazzoleni y col. (1993).

Ref (8). Pueyo (1994).

Ref (9). Nicolossi y col. (1995).

*: alcoholes superiores y acetato de etilo.

** : Intervalo de concentraciones máximo y mínimo encontrado por los distintos autores en los vinos espumosos.

3.6.2.1 Ésteres

La concentración de los diferentes ésteres analizados en los vinos espumosos es menor que en los respectivos vinos base, excepto el acetato de etilo, el succinato de dietilo, y especialmente el lactato de etilo, en los vinos elaborados con las variedades Trepát y Monastrell. La producción de un incremento tan grande del lactato de etilo en los vinos espumosos de 9 meses de envejecimiento en botella con respecto a sus correspondientes vinos base, se debe a que estos vinos hicieron la fermentación maloláctica y por tanto se formó ácido láctico, después de embotellado. En ninguno de los vinos analizados se detectaron los acetatos de isobutilo y de butilo.

Es muy escasa la información bibliográfica existente respecto a la composición volátil de los vinos espumosos rosados. Vlasova y col., (1995), han analizado diferentes compuestos volátiles en dos vinos espumosos rosados comerciales, y otros dos elaborados con mezclas de variedades blancas (Riesling y Rkatsiteki) y tintas (Cabernet, Saperavi, y Monastrell), fermentados en grandes envases. Han encontrado un rango de concentraciones para el acetato de etilo muy amplio, desde 2,91 a 75,6 mg/L. También el acetato de isobutilo lo han encontrado en concentraciones muy variables, de 2,72 a 25,35 mg/L. Sólo en uno de los vinos han detectado butanoato de etilo, con una concentración de 0,2 mg/L. Las concentraciones de acetato de isopentilo y de hexilo encontradas, han sido de 0,16 a 2,46 mg/L, y entre 0,0 y 0,2 mg/L, respectivamente, que son en general valores menores que los que se han determinado en los vinos espumosos de la variedad Garnacha. También la concentración de octanoato de etilo, y succinato de dietilo que han determinado, ha sido menor, entre 0,0 a 0,2 mg/L, y de 0,24 a 0,77 mg/L, respectivamente. La concentración de lactato de etilo en los vinos que analizaron, es más elevada que la determinada en los vinos espumosos de la variedad Garnacha, entre 20,8 y 60,2 mg/L, aunque esto va a depender fundamentalmente, como se ha comentado en anteriores ocasiones de la intensidad de la fermentación maloláctica.

3.6.2.2 Alcoholes

Los alcoholes isoamílicos, 2 y 3-metil-1-butanol, son los alcoholes que se encuentran en mayor concentración en todos los vinos espumosos. En algunos vinos, como los elaborados con las variedades Trepát y Monastrell, el 3-metil-1-butanol, tiene valores más altos (172 a 196 mg/L), que los determinados para la suma de los dos alcoholes isoamílicos en los vinos espumosos elaborados con variedades blancas (93-182 mg/L). No obstante, la suma de todos los alcoholes superiores (1-propanol, isobutanol, 1-hexanol, y alcoholes isoamílicos) en todos los vinos espumosos, no superan los 400 mg/L, que se ha descrito proporcionarían al vino aromas indeseables (Rapp y Mandery, 1986).

La concentración de los demás alcoholes está en el rango determinado por otros autores, aunque es importante recalcar las diferencias que existen en la concentración de alguno de ellos entre los vinos elaborados con diferentes variedades. Así los alcoholes isobutanol, y 1-hexanol, están en mayor concentración en los vinos base de la variedad Trepát, con valores medios de 46,6 y 1,39 mg/L respectivamente, que los vinos elaborados con la variedad Monastrell, que tiene valores medios de 27,9 y 0,7 mg/L. En cambio los alcoholes 1-propanol, y metanol, están en mayor concentración en los vinos base elaborados con la variedad Monastrell, con valores medios de 19,01 y 50,32 mg/L, que en los elaborados con la variedad Trepát, 13,3 y 44,8 mg/L respectivamente.

3.6.2.3 Ácidos grasos

La concentración de los ácidos grasos volátiles en los vinos espumosos, es en general algo inferior que en los respectivos vinos base. Los ácidos hexanoico y octanoico, son los mayoritarios, y el ácido decanoico, es el que se encuentra en menor concentración en todos los vinos espumosos. En los vinos espumosos elaborados con la variedad Parellada el ácido octanoico, es el que aparece en mayor concentración, entre 8,58 y 22,82 mg/L, seguido del ácido hexanoico con una concentración entre 1,79 y 17,46 mg/L. El ácido decanoico es el cuantitativamente menos importante ya que aparece en un rango de 0,86 a 3,01 mg/L. En los vinos espumosos de la variedad

Parellada, se han encontrado las concentraciones más elevadas para este tipo de compuestos.

Los valores, en general, están dentro del rango encontrado por otros autores, y no superan los umbrales de detección, que están establecidos en 8, 13 y 10 mg/L, para los ácidos hexanoico, octanoico, y decanoico respectivamente (Tomado de Lambrechts y Pretorius, 2000). Sólo en alguno de los vinos espumosos de la variedad Parellada se han determinado valores de ácido hexanoico y octanoico que superan estos umbrales.

3.6.2.4 Otros compuestos

Al igual que en los vinos base, los vinos espumosos tienen un rango muy amplio de concentración de acetaldehído, entre 11,9 y 102 mg/L Pueyo (1994), determina acetaldehído en vinos de cava, en concentraciones comprendidas entre 26,9 y 261,7 mg/L Tiene un umbral de percepción muy alto, de 100 mg/L, y se le han atribuido aromas de vinagre, manzana verde, etc (tomado de Pretorius y Lambrechts, 2000). Los vinos espumosos elaborados con la variedad Monastrell son los que tienen los valores más altos, y los elaborados con la variedad Garnacha, los más bajos. La γ -butirolactona no se ha detectado en ninguno de los vinos espumosos analizados.

3.6.3 Influencia de distintas variables en la concentración de los compuestos volátiles de los vinos.

Son muchos los factores que pueden influir en la concentración de los compuestos volátiles de los vinos espumosos. Entre ellos y como más relacionados con el proceso en sí de elaboración, la existencia de la segunda fermentación y el tiempo de envejecimiento con las levaduras. También la cepa de levadura empleada en la segunda fermentación, que se adicione o no bentonita en el licor de tiraje, las condiciones de cultivo de la viña, y la variedad de uva de la que proceden los vinos puese tener influencia en la composición de la fracción volátil. Por ello se ha realizado este estudio. Las otras variables estudiadas son la segunda fermentación, que es el periodo comprendido desde el inóculo con las levaduras en el tiraje hasta los 40 días en las que ya no hay células viables en los vinos, y el periodo de tiempo en el que los vinos envejecen en la botella con las levaduras. Se ha determinado la influencia del tiempo de

envejecimiento desde 40 a 270 días, es decir vinos que aún cumpliendo la Normativa legal de un mínimo de 9 meses de envejecimiento, son de tiempo de envejecimiento corto. Además se ha comprobado la influencia de periodos de tiempo más largos, desde 9 hasta 18 meses, para comprobar si esto mejora o no la composición volátil de los vinos, lo que repercutirá en la calidad de los mismos.

Para conocer la existencia de relaciones entre los compuestos volátiles determinados en los vinos y estas variables, se han utilizado los vinos elaborados con diferentes cepas de levadura y con adición o no de bentonita descritos en el apartado 2.1.1, los vinos espumosos elaborados con la variedad Parellada sometidas a diferentes condiciones de cultivo, y descritos en el apartado 2.1.2, y los vinos elaborados con las variedades Trepát y Monastrell, descritos en el apartado 2.1.3, para conocer la influencia que sobre los compuestos volátiles de estos vinos, tendrán el envejecimiento con las levaduras de hasta 18 meses. Se ha empleado el test de la *t* de student para comprobar si existen o no diferencias significativas entre el vino base, y los vinos espumosos de 40 días, es decir para comprobar la influencia de la segunda fermentación. Para determinar el efecto de la cepa de levadura empleada, de la adición de bentonita, de las condiciones de cultivo y del tiempo de envejecimiento con las levaduras, se ha empleado la técnica del análisis de varianza, (ANOVA), mezclando las interacciones con el término del error

El resultado de la aplicación de estas técnicas estadísticas, se resume en la **tabla 34**, en la que se muestran los compuestos volátiles que están influenciados significativamente por los distintos factores estudiados.

Tabla 34. Influencia de distintas variables en los compuestos volátiles determinados en los vinos estudiados.

Compuestos	Cepa de levadura	Bentonita	Condiciones de cultivo	2º Fermentación	Tiempo de envejecimiento (40-270 días)	Tiempo de envejecimiento (9-18 meses)
Esteres						
Acetato de etilo	n.s.	n.s.	*	*	*	*
Butanoato de etilo	n.s.	n.s.	*	*	*	n.s.
Acetato de isopentilo	n.s.	n.s.	*	*	*	n.s.
Hexanoato de etilo	-	-	*	-	-	n.s.
Acetato de hexilo	n.s.	n.s.	*	*	*	n.s.
Octanoato de etilo	n.s.	n.s.	n.s.	*	*	*
Decanoato de etilo	n.s.	n.s.	n.s.	*	*	*
Succinato de dietilo	n.s.	n.s.	n.s.	*	*	*
Lactato de etilo	n.s.	n.s.	*	-	-	*
Alcoholes						
Metanol	n.s.	n.s.	*	*	*	n.s.
1-Propanol	n.s.	n.s.	*	*	n.s.	*
Isobutanol	n.s.	n.s.	*	*	*	*
2-metil-1-butanol	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	*
3-metil-1-butanol	n.s.	n.s.	*	*	n.s.	*
1-hexanol	n.s.	n.s.	*	n.s.	*	n.s.
cis-3-hexen-1-ol	-	-	*	-	-	n.s.
Ácidos grasos						
Ácido hexanoico	n.s.	n.s.	*	n.s.	*	n.s.
Ácido octanoico	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.
Ácido decanoico	n.s.	n.s.	*	*	*	n.s.
Otros compuestos						
Acetaldehído	n.s.	n.s.	*	*	*	n.s.

*: influencia significativa; n.s: No influyó significativamente; -: compuesto no analizado en los vinos.

3.6.3.1 Influencia de la cepa de levadura empleada en la segunda fermentación, y de la adición de bentonita en el licor de tiraje.

Como se muestra en la **tabla 34**, los factores cepa de levadura, así como adición de bentonita en el licor de tiraje, no influyen significativamente en la concentración de ninguno de los compuestos volátiles analizados.

Las levaduras con las que se han realizado los tirajes fueron seleccionadas por Martínez-Rodríguez y col. (2001) por reunir las características adecuadas para la elaboración de este tipo de vinos. Entre las características que deben reunir estas levaduras se encuentran, la resistencia al etanol, un elevado poder fermentativo a baja temperatura, baja producción de H_2S , resistencia al SO_2 , floculación moderada, no adherencia a la pared de vidrio de la botella, baja producción de acidez volátil, elevada capacidad autolítica, así como una elevada capacidad espumante. Se partió de 34 cepas del género *Saccharomyces*, 32 de ellas de la colección del Instituto de Fermentaciones Industriales, resultando seleccionadas la P-29 y las IFI-473 y 475. Estas dos últimas cepas habían sido consideradas desde el momento de su aislamiento en los años 1957 y 1958 respectivamente, como cepas distintas, sin embargo en estudios posteriores llevados a cabo con técnicas de biología molecular se comprobó que se trataba de la misma cepa. Con el objetivo de comprobar si el hecho de que las levaduras fueran tratadas desde 1951 como cepas diferentes había modificado alguna de sus características, se realizaron los tirajes con cada una de esta cepa por separado. La cepa EC1118 se incluyó por ser una de las mas utilizadas en la industria para elaborar vinos espumosos y nos podría servir de referencia y la cepa J porque con ella habían obtenido muy buenos resultados en la empresa en la que se elaboraron los vinos. Posiblemente el hecho de que las cepas aquí utilizadas hayan sido sometidas a un proceso de selección muy exigente, para así obtener las cepas de levaduras que cumplan con los requisitos necesarios para la elaboración de vinos espumosos, y que han sido mencionados con anterioridad, hace que todas sean muy similares y que por tanto no se detecten diferencias en los compuestos volátiles analizados entre los vinos elaborados con cada una de las cepas.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Cavazza y col. (1990). Sin embargo Piracci y col. (1992), encontraron diferencias en la composición de vinos espumosos elaborados con una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* y los elaborados con una cepa de *S. bayanus* comprobando que con esta última se producía mayor cantidad de acetatos de alcoholes superiores y de ésteres de ácidos grasos.

La no existencia de diferencias entre la concentración de los compuestos volátiles de los vinos elaborados con bentonita y de los vinos elaborados sin adición de bentonita en la solución de tiraje, coincide con los resultados de Gerbi y col. (1990).

La utilización de bentonita para la clarificación de los vinos influye en su composición volátil (Guillou y col., 1998; Puig-Deu y col., 1999). El hecho de no haber encontrado ninguna influencia de la bentonita añadida para facilitar el degüelle en los compuestos volátiles de los vinos estudiados, puede ser debido a que la cantidad añadida en este caso es unas diez veces menor que la que se utiliza cuando se usa como clarificante. No obstante, en el análisis sensorial de estos mismos vinos (Martínez-Rodríguez, 2000), los catadores prefirieron los vinos elaborados sin bentonita a los elaborados con bentonita, lo que indica que el empleo de bentonita durante el tiraje, a pesar de la baja concentración utilizada, influye en el conjunto de sensaciones visuales, olfativas y gustativas.

3.6.3.2 Influencia de las condiciones de cultivo

Como se puede observar en la **tabla 34** las condiciones de cultivo afectan a casi la totalidad de los compuestos volátiles analizados, únicamente los ésteres octanoato y decanoato de etilo, así como el succinato de dietilo, el alcohol 2-metil-1-butanol y el ácido octanoico, no están influídos significativamente por la práctica vitícola. Trabajos previos, en los que se ha estudiado principalmente la composición terpénica de vinos italianos (Stefano y col., 1983; Corino y Stefano., 1984), han determinado una mayor concentración de compuestos volátiles, en los vinos procedentes de viñedos de baja producción, en comparación con los de alta producción.

Se puede comprobar en las **tablas 27, 28 y 29**, que los vinos B de la variedad Parellada, procedentes de viñedos cultivados de forma tradicional, tienen un contenido

mayor de butanoato de etilo, acetato de isopentilo y de hexilo, de los alcoholes 3-metil-1-butanol, 1-hexanol y cis-3-hexen-1-ol, y de los ácidos grasos volátiles hexanoico y decanoico, así como una mayor concentración de acetaldehído. Sinton y col (1978), determinaron en un estudio que realizaron para comprobar el efecto de la producción del viñedo en la calidad de los vinos, que con la uvas de las viñas de baja producción se obtenían vinos con mayor concentración de acetatos, lo que concuerda con los resultados aquí obtenidos.

Los ésteres, butanoato y hexanoato de etilo, y los acetatos de isoamilo y de hexilo que se han encontrado en mayor concentración en los vinos procedentes de uvas de viñedos de baja producción, tienen una gran importancia en el aroma. En la bibliografía, está ampliamente documentada su contribución a las notas frutales y florales muy apreciadas en el aroma de los vinos (Suomalainen y Lehtonen, 1979; Noble y col., 1980, etc).

Los alcoholes 3-metil-1-butanol, 1-hexanol, y cis-3-hexen-1-ol, también están en mayor concentración en los vinos PB1 y PB2. Estos dos últimos compuestos, son de origen no fermentativo, y contribuyen al aroma primario o varietal de los vinos. Luego la práctica vitícola además de producir cambios en el contenido de compuestos responsables del aroma secundario, también afecta a los constituyentes del aroma primario.

Los ácidos hexanoico y decanoico están también en mayores concentraciones en los vinos procedentes de viñedos no sometidos a sobreexplotación. La concentración media de ácido hexanoico en los vinos B de la variedad Parellada, es bastante alta, alrededor de 10 mg/L. El umbral de percepción de este compuesto se ha calculado entre 8 y 9 mg/L (tomado de Lambrechts y Pretorius, 2000). Estos mismos autores han descrito que su presencia en concentraciones mayores comunica al vino aromas desagradables a “agrio”, “vinagre”, “rancio”, “picante”, etc.

Los vinos A de la variedad Parellada, procedentes de uvas cultivadas en condiciones de sobreexplotación, tienen mayor concentración de los compuestos volátiles, metanol, 1-propanol, isobutanol que los vinos B procedentes de viñedos sometidos a las práctica trdicionales de cultivo. También los vinos A tienen mayor

concentración de acetato y lactato de etilo que los B, pero esto puede atribuirse a que en los vinos A se ha producido la fermentación maloláctica (**Tabla 13**). El acetato de etilo, puede producir características negativas en los vinos, cuando aparece por encima de su umbral de detección, establecido en 17,62 mg/L, ya que este compuesto esta relacionado con aromas a “pegamento”, “disolventes”, etc, en cualquier caso negativos para el aroma.

3.6.3.3 Influencia de la segunda fermentación

Como se puede comprobar en la **tabla 34**, la segunda fermentación es una etapa que influye significativamente en la práctica totalidad de los compuestos volátiles analizados en los vinos. Únicamente el 1-hexanol, y los ácidos hexanoico y octanoico no varían respecto a la concentración del vino base.

El empleo de el test de la t de student en el que se compara un único vino base con los vinos de 20 y 40 días respectivamente, permite comprobar si los cambios que se observan en la concentración de los compuestos volátiles en los vinos espumosos de 20 o 40 días son significativos o no, respecto a l vino base.

Durante los primeros 20 días de fermentación se produce una disminución del butanoato de etilo, de los acetatos de etilo, de isoamilo y de hexilo, del octanoato y decanoato de etilo y del ácido decanoico. Algunos de estos compuestos como los acetatos de isoamilo y de hexilo, el octanoato y decanoato de etilo y el ácido decanoico, siguen disminuyendo significativamente entre los 20 y los 40 días. La concentración de los demás compuestos no experimenta cambios en esta etapa.

En los primeros 20 días de fermentación, se producen incrementos significativos respecto al vino base, del succinato de dietilo, acetaldehído metanol, 1-propanol, isobutanol, y de los alcoholes isoamílicos. El aumento continúa hasta los 40 días en todos estos compuestos con excepción del succinato de dietilo.

El contenido de ésteres en los vinos, aumenta por el metabolismo de las levaduras debido a la alcoholisis del acil-CoA o a partir de los esqueletos de carbono de los aminoácidos. Todos los ésteres en los vinos estudiados disminuyen durante la

fermentación, excepto el succinato de dietilo. Fraile y col., (2000), indican que muchos de los ésteres se forman durante la segunda mitad de la fermentación, cuando se ha consumido aproximadamente un 75% de los azúcares del mosto. Algunos autores han determinado un descenso tras la producción de algunos ésteres, como el acetato de isoamilo (Fraile y col., 2000), indicando que esto se debe a la hidrólisis que se produce como consecuencia de esterases de las levaduras (Mauricio y col., 1997) en etapas avanzadas de la fermentación.

Otros autores como Herráiz (1989a y 1990b), encuentra para el acetato de etilo una producción discontinua durante la fermentación de un mosto con *Saccharomyces cerevisiae*. Determina un aumento muy importante en la concentración de este compuesto al quinto día de fermentación, y una brusca disminución a partir de este momento, hasta el décimo día en que vuelve a aumentar. También determina menor concentración de acetato de hexilo en los vinos durante los primeros días de fermentación que en el mosto de partida. Transcurrida la etapa de fermentación, este compuesto comienza a aumentar. Además comprueba que los ésteres de los ácidos de cadena larga como el miristato, el palmitato y el estearato de etilo, se sintetizan en la etapa temprana de la fermentación pero disminuyen rápidamente al final de la misma lo que atribuye a su adsorción por la pared de la levadura. El succinato de dietilo, es el único éster que aumenta durante este periodo.

La concentración de todos los **alcoholes** analizados en los vinos, excepto el 1-hexanol, cuya concentración permanece constante durante esta etapa, está influida significativamente por la segunda fermentación, y todos ellos aumentan en esta etapa. Fraile y col., (2000), indican que el 1-propanol, y sobre todo los alcoholes isobutanol e isoamilicos se producen principalmente en las etapas finales de la fermentación, una vez que se ha consumido la mayor parte de azúcares del medio. Indican que esto es debido a que los distintos alcoholes superiores se producirían en esta etapa, no a partir del aminoácido correspondiente, sino a partir de los cetoácidos que se encontrarían en exceso, y que se originan tanto a partir de carbohidratos como de la desaminación de aminoácidos que estaban presentes en el medio.

El metanol aumenta también durante esta etapa. Este compuesto no procede mayoritariamente de la fermentación, sino de la hidrólisis de las pectinas de la uva y no

teniendo mucha importancia en el aroma global del vino (Nykanen, 1986). El acetaldehído subproducto de la fermentación alcohólica, aumenta en esta etapa.

El ácido decanoico, es el único de los **ácidos grasos** determinados en los vinos, que experimenta variaciones en la etapa fermentativa. La concentración disminuye progresivamente desde el vino base, hasta los 40 días.

La disminución del ácido decanoico, en estadios finales de la fermentación, ha sido reportada por otros autores durante la fermentación de los mostos (Fraile y col., 2000; Herraiz y col., 1989). Estos autores atribuyen esta disminución a la adsorción a las paredes de las levaduras.

3.6.3.4 Influencia del tiempo de envejecimiento con las levaduras (90 a 270 días)

Tiempo de envejecimiento entre 40 a 270 días:

Como puede observarse en la **tabla 34**, todos los compuestos volátiles excepto los alcoholes isoamílicos y el 1-propanol, están influenciados significativamente por el tiempo de envejecimiento entre 90 a 270 días. Postel y Ziegler (1991), tampoco encontraron diferencias durante el envejecimiento de un vino espumoso con levaduras en algunos compuestos volátiles mayoritarios que se determinan por inyección directa como el metanol, y los alcoholes superiores. Mólnar y col. (1981), encontraron las mayores diferencias debidas al envejecimiento en los compuestos volátiles minoritarios, e indican que estos son los que realmente proporcionan las características aromáticas peculiares a este tipo de vinos.

Por tanto el tiempo de envejecimiento desde 90 a 270 días influye en la concentración de la práctica totalidad de los compuestos volátiles analizados.

Como se puede comprobar en las **tablas 21 y 24**, a partir de los 90 días se produce una disminución de todos los ésteres, excepto el acetato de isopentilo que aumenta a partir de los 270 días, y el succinato de dietilo que aumenta de manera continua desde los 90 a los 270 días. Silva y col. (1987), detectaron un descenso de

acetato de isopentilo a partir de los siete meses de envejecimiento. Algunos autores consideran que este compuesto contribuye al carácter afrutado de los vinos, aportando notas aromáticas que recuerdan a plátano, y siendo considerado como factor de calidad de los vinos (Van der Merwe, 1981). Hay muchos autores que coinciden en que aumenta el succinato de dietilo durante el envejecimiento de vinos espumosos (Silva y col., 1987; Gordillo 1990; Postel y Ziegler, 1991; Nicolosi y col., 1995; etc.).

En la **tablas 22 y 25**, se muestran la concentración de los distintos alcoholes analizados en los vinos durante este periodo. A partir de los 40 días de envejecimiento, ni el 1-propanol ni los alcoholes isoamílicos experimentan cambios significativos. Postel y Ziegler (1991), y Gordillo, (1990), tampoco encontraron cambios apreciables en los alcoholes superiores a lo largo del tiempo de envejecimiento. A partir de los 90 días se observa una tendencia a disminuir el isobutanol.

Desde los 90 hasta los 270 días el 1-hexanol aumenta de manera constante, y a partir de los 270 días, disminuye encontrándose valores incluso más bajos que los del vino base. Gordillo (1990), encontró que el 1-hexanol disminuía a lo largo del envejecimiento de vinos de cava.

En las **tablas 23 y 26**, se puede comprobar que tanto el ácido hexanoico como el octanoico experimentan un aumento durante este periodo. El aumento se produce hasta los 270 días en el caso del octanoico, a partir de aquí, se produce un brusco descenso. El hexanoico aumenta de manera progresiva durante todo este periodo. Silva y col., (1987), encontraron un aumento de ácidos grasos volátiles en los vinos espumosos que analizaron a medida que aumentaba el tiempo de envejecimiento. El contenido de ácido decanoico sin embargo, disminuye durante este periodo de tiempo.

El aumento en los ácidos grasos hexanoico y decanoico, puede ser consecuencia del proceso de autólisis de las levaduras. Este hecho ha sido indicado por otros autores (Chen y col., 1980), en la autólisis inducida en la producción de cervezas. Estos autores demostraron principalmente la liberación al medio de ácidos octanoico y decanoico. En los vinos estudiados se han determinado aumentos durante este periodo de los ácidos hexanoico y octanoico, sin embargo el decanoico disminuye durante esta etapa. La disminución de este ácido puede producirse por adsorción a las paredes de las levaduras

(Lafon-Lafourcade y col., 1984), ya que es el más hidrofóbico de los estudiados, por tanto aunque se liberara durante la autólisis al ser más hidrofóbico se adsorbería con más eficacia que los otros dos, y por tanto, no se detectaría el aumento que pudiera producirse.

Otra explicación para la disminución observada en los ácidos grasos, especialmente decanoico, podría ser la formación de otros compuestos como ésteres, cetonas o aldehídos a partir de estos (Charpentier y Feuillat, 1993), aunque sólo se ha observado el aumento de succinato y de acetato de isopentilo.

Shinohara (1985), indica que cuando la concentración de hexanoico, octanoico, y decanoico se encuentra alrededor de 20 mg/L, el vino adquiere olores desagradables. En los vinos estudiados en ningún caso se superó esta cantidad.

Viegas y col. (1989), encontraron que un medio rico en ácidos grasos de cadena media, particularmente octanoico y decanoico, en concentraciones de 16 y 18 mg/L aumentan la fase de latencia, y disminuyen el crecimiento de la biomasa de levaduras.

Ravaglia y Delfini (1994), en vino "Asti espumante" demuestran que los ácidos decanoico y octanoico podrían ser metabolizados por las levaduras como intermediarios en la biosíntesis de ácidos grasos de larga cadena y lípidos, o bien podrían reaccionar enzimática o químicamente con el etanol.

El acetaldehído, como puede comprobarse en las **tablas 23 y 26**, experimenta durante este periodo una disminución hasta los 270 días, que se puede atribuir a fenómenos de reducción o de combinación.

Tiempo de envejecimiento entre 9 y 18 meses:

En la **tabla 34**, se puede comprobar que el tiempo de envejecimiento entre 9 y 18 meses, influye significativamente en algunos de los compuestos volátiles analizados en los vinos. De los ésteres analizados, el acetato, octanoato, decanoato y lactato de etilo, así como el succinato de dietilo, varían su concentración durante este periodo.

También los alcoholes superiores 1-propanol, isobutanol, y los dos alcoholes isoamílicos.

El acetato y lactato de etilo, experimentan aumentos durante este periodo. Estos dos compuestos se pueden producir como consecuencia de la fermentación de pentosas por ciertas bacterias lácticas, como *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Lomvauden Riberau-Gayón y col, 2000). El aumento en estos dos compuestos se produce fundamentalmente durante los 9 y 12 meses de envejecimiento, esto querría decir que en este periodo de tiempo, aún quedan microorganismos viables en el vino. La fermentación maloláctica es aconsejada en los vinos base destinados a la elaboración de espumosos, ya que una fermentación maloláctica en botella puede causar problemas durante el envejecimiento, como paradas en la fermentación, excesiva presión de CO₂ en la botella, o la aparición de aromas y sabores desagradables así como aumento de la acidez volátil.

El aumento de acetato y lactato de etilo, es un indicio de fermentación maloláctica durante el envejecimiento de los vinos. El hecho de que se produzca en tiempos de envejecimiento a partir de los 9 meses, y continúe, ya que estos compuestos lactato, siguen aumentando en los vinos, quiere decir, que hay bacterias viables en el vino en este tiempo, y dado que la concentración de nutrientes es muy baja durante este periodo, la liberación de diferentes productos del citoplasma de las levaduras, o bien azúcares procedentes de la hidrólisis de glucoproteínas de la pared, podrían servir de nutrientes a estas bacterias que serían las responsables de estos aumentos.

A la vista de los resultados sería aconsejable provocar la fermentación maloláctica en el vino base antes de realizar la segunda fermentación, o bien llevar a cabo otros tratamientos como la filtración amicróbica del vino base antes ser embotellado en condiciones estériles e inoculado con cultivos puros de levaduras. Otra posibilidad sería controlar el sulfitado del vino, la temperatura de conservación, y una correcta preparación del inóculo deberían ser esenciales para evitar que ocurra este fenómeno durante el envejecimiento de los vinos en botella.

Los otros ésteres que experimentan cambios durante este periodo, son el hexanoato y decanoato de etilo. Estos dos compuestos disminuyen durante todo este

tiempo. La disminución de estos ésteres durante el envejecimiento, podría deberse tanto a adsorción de estos compuestos a las paredes de las levaduras, como han comprobado otros autores que ocurre en medio sintético (Lafon-Lafourcade y col., 1984), o en vinos envejecidos bajo flor (Zea y col., 1994), o también podría ser debido a la hidrólisis química de este tipo de compuestos, que sería normal al pH del vino, como sugieren Ramey y Ough (1980).

El succinato de dietilo, es junto al lactato, y al acetato de etilo, el único éster que experimenta aumentos durante este periodo. El succinato de dietilo, como se comprobó en el apartado anterior experimentaba un aumento muy importante a los 90 días de envejecimiento, y esto coincidía con el inicio de la autólisis de las levaduras en esos vinos e (Martínez-Rodríguez, 2000). En los vinos que se han estudiado para estudiar el efecto del tiempo de envejecimiento de 9 a 18 meses, en los compuestos volátiles (vinos elaborados con las variedades Trepát, Monastrell y Parellada), se ha comprobado que se producen aumentos en el nitrógeno proteico y peptídico, a partir de los 12 meses alcanzando la mayor concentración a los 15 (apartados 3.5.2 y 3.5.3). Este aumento podría estar indicando el comienzo de la autólisis de las levaduras que se iniciaría en este periodo. Por tanto, el aumento de este compuesto durante el envejecimiento, coincide con el inicio de la autólisis de las levaduras.

El 1-propanol, y el isobutanol, experimentan pequeños aumentos durante el envejecimiento. Los alcoholes isoamílicos aumentan hasta los 15 meses, y posteriormente disminuyen a los 18 meses. El valor más alto de concentración se produce a los 15 meses, para el isobutanol, y los alcoholes isoamílicos, mientras que es los 18 meses en el caso del 1-propanol.

Los alcoholes superiores, son producidos por las levaduras, durante la fermentación alcohólica, a partir de los aminoácidos presentes en el medio, fundamentalmente, valina, leucina, isoleucina, treonina y fenilalanina. También pueden ser producidos *de novo* a partir de carbohidratos. El mecanismo de Ehrlich o formación catabólica de los alcoholes superiores conlleva una transaminación entre un aminoácido y un α -cetoácido, que implica una decarboxilación y reducción al correspondiente alcohol (Zoecklein y col., 1995) El paso final de la reducción envuelve la reoxidación de $\text{NADH} + \text{H}^+$ en NAD^+ , y ayudaría a mantener el balance redox dentro de la célula.

Como se comprobó en el apartado 3.5.2 y 3.5.3, en estos vinos se detecta un aumento en la concentración de nitrógeno amínico a partir de los 15 meses de envejecimiento, que coincide con el valor más alto en la concentración de todos estos alcoholes, excepto como hemos indicando el 1-propanol, con valores más altos a los 18 meses. El aumento detectado en estos compuestos puede ser debido a la liberación de aminoácidos durante la autólisis, ya que son sustratos para su formación. A los 15 meses ya no quedarían células viables en el vino para llevar a cabo la transformación de los aminoácidos en los correspondientes alcoholes, sin embargo, sí pueden estar presentes en el medio, consecuencia de nuevo de la autólisis, las enzimas de la levadura responsables de llevar a cabo esta transformación. Esta podría ser la explicación al aumento de los alcoholes superiores durante el envejecimiento.

Ninguno de los ácidos grasos analizados están influídos significativamente por el tiempo de envejecimiento, y los vinos espumosos de 18 meses mantienen una concentración similar a la de los vinos de 9 meses.

3.6.3.5 Resumen de los cambios producidos durante la segunda fermentación y el envejecimiento de los vinos en presencia de levaduras.

Durante la segunda fermentación todos los ésteres, excepto el succinato de dietilo disminuyen. Por el contrario, todos los alcoholes analizados en los vinos, excepto el 1-hexanol aumentan. El único ácido graso volátil, de los analizados que tienen variaciones en su concentración, es el ácido decanoico, que experimenta una disminución. Durante el periodo de envejecimiento comprendido entre los 90 y los 270 días, es decir de 3 a 9 meses, todos los ésteres excepto el succinato y el acetato de isoamilo, siguen disminuyendo. Los alcoholes experimentan pocas variaciones en esta etapa, y sólo en el 1-hexanol, y el metanol, se producen pequeños aumentos. Se observa un leve aumento de los ácidos hexanoico y octanoico durante este periodo, y una disminución del decanoico. Entre 9 y 18 meses, el tiempo de envejecimiento tiene menos influencia en los compuestos volátiles, que en la etapa anterior. Se produce una disminución de los ésteres de elevado tamaño, octanoato y decanoato de etilo, mientras que el succinato de dietilo, sigue aumentando. Todos los alcoholes superiores excepto el

1-hexanol, experimentan aumentos en esta etapa. Los ácidos grasos volátiles, no van a verse afectados.

3.7 Compuestos fenólicos de bajo peso molecular en vinos base y vinos espumosos

En el siguiente apartado se estudian los compuestos fenólicos de bajo peso molecular de los vinos espumosos elaborados con la variedad Parellada, comprobando la influencia de las condiciones de cultivo, y el tiempo de envejecimiento con las levaduras en la concentración de los mismos. Además se estudiará la composición fenólica de los vinos base y de los espumosos elaborados con variedades de uvas tintas, tanto vinificadas en blanco como en rosado. Se estudiarán las diferencias entre las distintas variedades empleadas en la elaboración de los vinos, y los cambios producidos durante la segunda fermentación y el envejecimiento.

3.7.1 Concentración de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular en los vinos

En las **tablas 35 a 40**, se recogen los valores de concentración de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular, detectados en todos los vinos base y en los vinos espumosos. Se han analizado los vinos espumosos elaborados con la variedad Parellada, el vino base Tipus y los espumosos respectivos, así como los vinos base y espumosos elaborados con las variedades Trepát, Monastrell y Garnacha. Todos estos vinos están descritos en los apartados 2.1.2, 2.1.3 y 2.1.4.

Tabla 35. Concentración (mg/L) de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular analizados en los vinos espumosos A de la variedad Parellada .

	Parellada A1				Parellada A2			
	V 9m	V 12m	V 15 m	V 18 m	V 9m	V 12m	V 15 m	V 18 m
Ácidos hidroxibenzoicos								
Gálico	0,53	0,61	0,59	0,69	0,66	0,49	0,45	1,02
Protocatéquico	0,51	0,59	0,54	0,65	0,55	0,43	0,53	0,54
p-Hidroxibenzoico	0,16	0,14	0,13	0,16	0,24	0,12	0,15	0,17
Vainillínico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Siringico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácidos hidroxicinámicos								
trans-Cafeico	1,32	1,32	1,46	1,62	1,09	0,90	1,26	1,32
cis-p-Cumárico	0,48	0,53	0,50	0,59	0,57	0,34	0,42	0,46
trans-p-Cumárico	0,52	0,54	0,51	0,60	0,58	0,35	0,42	0,48
Ésteres hidroxicinámicos								
cis-Caftárico	1,46	1,41	0,98	1,14	0,86	1,00	0,64	0,83
trans-Caftárico	10,86	9,51	9,35	10,74	21,56	15,57	13,83	20,29
cis-Cutárico	8,64	8,27	7,33	7,71	7,47	6,71	5,95	7,15
trans-Cutárico	2,37	2,51	2,01	2,46	2,58	1,94	1,62	2,09
trans-Fertárico	0,35	0,33	0,22	0,35	0,33	0,31	0,28	0,32
Estilbenos								
cis-Glucósido de resveratrol	0,58	0,56	0,46	0,75	0,82	0,49	0,49	0,40
trans-Glucósido de resveratrol	0,33	0,33	0,32	0,50	0,23	0,19	0,18	0,19
Cis-Resveratrol	0,13	0,22	0,15	0,17	0,18	0,32	0,17	0,28
Otros								
Tirosol	13,36	12,52	9,82	10,00	12,42	8,22	10,95	7,60
Triptofol	2,23	1,29	1,62	1,58	1,64	1,03	1,50	1,34
Catequina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabla 36. Concentración (mg/L) de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular determinados en los vinos espumosos B, de la variedad Parellada.

	Parellada B1				Parellada B2			
	V 9m	V 12m	V 15 m	V 18 m	V 9m	V 12m	V 15 m	V 18 m
Ácidos hidroxibenzoicos								
Gálico	0,38	0,20	0,21	0,18	0,34	0,51	0,25	0,27
Protocatéquico	0,61	0,60	0,73	0,57	0,34	0,57	0,15	0,41
p-Hidroxibenzoico	0,20	0,17	0,22	0,18	0,08	0,15	0,06	0,09
Vainillínico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Siringico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácidos hidroxicinámicos								
trans-Cafeico	0,55	0,60	0,91	0,91	0,64	0,83	0,54	0,96
cis-p-Cumárico	0,25	0,25	0,32	0,33	0,23	0,42	0,16	0,24
trans-p-Cumárico	0,17	0,29	0,25	0,25	0,17	0,34	0,20	0,20
Ésteres hidroxicinámicos								
cis-Caftárico	1,64	1,13	1,46	1,32	2,28	1,32	2,17	1,23
trans-Caftárico	34,16	29,18	35,97	35,66	35,20	43,02	23,92	34,55
cis-Cutárico	6,11	5,46	6,36	5,98	4,40	4,74	3,06	3,92
trans-Cutárico	1,92	1,72	2,00	1,88	2,82	3,27	2,18	2,68
trans-Fertárico	0,28	0,26	0,34	0,32	0,35	0,33	0,22	0,35
Estilbenos								
cis-Glucósido de resveratrol	0,19	0,30	0,34	0,26	0,20	0,25	0,14	0,18
trans-Glucósido de resveratrol	0,24	0,29	0,26	0,28	0,21	0,24	0,23	0,27
Cis-Resveratrol	0,13	0,12	0,14	0,15	0,14	0,14	0,13	0,14
Otros								
Tirosol	12,88	11,96	11,81	12,20	9,24	12,21	5,91	9,54
Triptofol	2,11	1,87	1,93	1,76	1,45	1,03	0,69	1,49
Catequina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabla 37. Concentración (mg/L) de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular determinados en los vinos base y vinos espumosos denominados Tipus.

	Tipus				
	Vb	V 9m	V 12m	V 15 m	V 18 m
Ácidos hidroxibenzoicos					
Gálico	0,62	0,69	0,84	0,68	0,70
Protocatéquico	0,70	0,72	1,04	0,84	0,87
p-Hidroxibenzoico	0,20	0,17	0,29	0,22	0,22
Vainillínico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Siríngico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Ácidos hidroxicinámicos					
trans-Cafeico	1,06	0,93	1,35	1,32	1,38
cis-p-Cumárico	0,24	0,27	0,53	0,35	0,38
trans-p-Cumárico	0,16	0,22	0,30	0,27	0,27
Ésteres hidroxicinámicos					
cis-Caftárico	1,02	1,34	2,47	1,11	1,14
trans-Caftárico	24,04	16,44	21,07	19,39	20,28
cis-Cutárico	8,49	6,08	8,61	6,26	6,89
trans-Cutárico	2,47	2,17	3,32	2,66	2,54
trans-Fertárico	0,92	0,63	0,89	0,70	0,76
Estilbenos					
cis-Glucósido de resveratrol	0,39	0,37	0,58	0,45	0,46
trans-Glucósido de resveratrol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cis-Resveratrol	0,18	0,19	0,18	0,17	0,17
Otros					
Tirosol	9,02	8,86	11,94	9,38	8,52
Triptofol	1,20	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Catequina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Vb: Vino base; V 9m: Vino espumoso de 9 m; V 12m: Vino espumoso de 12m; V 15m: Vino espumoso de 15 meses; V 18m: Vino espumoso de 18 meses.

Tabla 38. Concentración (mg/L) de los compuestos fenólicos determinados en los vinos base y en los vinos espumosos de la variedad Trepát.

	Trepát 1					Trepát 2				
	Vb	V 9m	V 12m	V 15 m	V 18 m	Vb	V 9m	V 12m	V 15 m	V 18 m
Ácidos hidroxibenzoicos										
Gálico	0,71	0,56	0,58	0,57	0,67	0,55	0,56	0,66	0,45	0,38
Protocatéquico	0,85	0,71	0,42	0,59	0,70	0,63	0,51	1,06	0,51	0,44
p-Hidroxibenzoico	0,18	0,22	0,16	0,16	0,29	0,15	0,13	0,20	0,11	0,11
Vainillínico	0,59	0,60	0,41	0,28	0,40	0,45	0,35	0,56	0,36	0,29
Siríngico	0,61	0,72	0,71	0,69	0,73	0,76	0,68	0,77	0,70	0,62
Ácidos hidroxicinámicos										
trans-Cafeico	1,35	1,30	0,85	0,83	1,09	0,78	0,65	1,20	0,69	0,62
cis-p-Cumárico	0,28	0,43	0,37	0,38	0,43	0,27	0,29	0,46	0,32	0,27
trans-p-Cumárico	0,29	0,39	0,36	0,36	0,43	0,28	0,27	0,40	0,29	0,26
Ésteres hidroxicinámicos										
cis-Caftárico	0,23	0,15	0,16	0,16	0,13	0,22	0,18	0,18	0,15	0,05
trans-Caftárico	2,86	3,32	1,96	2,14	2,40	2,35	1,68	2,67	1,37	0,93
cis-Cutárico	2,19	2,53	1,74	1,74	2,01	1,81	1,43	2,19	1,41	0,86
trans-Cutárico	0,43	0,30	0,33	0,33	0,26	0,42	0,32	0,39	0,29	0,20
trans-Fertárico	0,10	0,17	0,08	0,05	0,08	0,15	0,09	0,15	0,08	0,05
Estilbenos										
cis-Glucósido de resveratrol	0,81	0,61	0,45	0,46	0,48	0,62	0,41	0,60	0,41	0,33
trans-Glucósido de resveratrol	0,30	0,31	0,33	0,33	0,33	0,39	0,33	0,43	0,29	0,38
Cis-Resveratrol	0,23	0,36	0,18	0,19	0,22	0,24	0,24	0,28	0,22	0,16
Otros										
Tirosol	18,03	16,78	13,14	14,31	17,41	10,48	13,09	19,14	13,18	8,84
Triptofol	1,97	1,45	0,60	0,91	1,34	2,10	1,34	1,41	1,09	0,82
Catequina	1,11	1,69	0,64	0,90	0,71	0,89	1,13	1,48	1,01	0,88

Vb: Vino base; V 9m: Vino espumoso de 9 m; V 12m: Vino espumoso de 12m; V 15m: Vino espumoso de 15 meses; V 18m: Vino espumoso de 18 meses.

Tabla 39. Concentración (mg/L) de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular determinados en los vinos base y en los vinos espumosos de la variedad Monastrell.

	Monastrell 1					Monastrell 2				
	Vb	V 9m	V 12m	V 15 m	V 18 m	Vb	V 9m	V 12m	V 15 m	V 18 m
Ácidos hidroxibenzoicos										
Gálico	0,36	0,53	0,46	0,64	0,63	1,33	0,88	0,72	0,93	0,70
Protocatéquico	0,50	0,74	0,30	1,02	0,90	1,66	1,21	0,89	1,18	0,89
p-Hidroxibenzoico	0,08	0,08	0,16	0,16	0,15	0,18	0,13	0,11	0,16	0,12
Vainillínico	0,45	0,70	0,28	1,04	0,94	1,75	1,01	0,82	2,36	0,81
Siringico	0,63	0,79	0,62	0,92	1,01	1,17	1,07	0,90	0,43	0,88
Ácidos hidroxicinámicos										
trans-Cafeico	0,10	0,22	0,06	0,47	0,35	0,08	0,19	0,16	0,21	0,16
cis-p-Cumárico	0,06	0,15	0,06	0,21	0,20	0,13	0,20	0,17	0,24	0,19
trans-p-Cumárico	0,07	0,13	0,06	0,15	0,15	0,12	0,15	0,14	0,17	0,15
Ésteres hidroxicinámicos										
cis-Caftárico	0,25	0,36	0,27	0,30	0,66	0,32	0,20	0,10	0,26	0,12
trans-Caftárico	1,70	2,74	1,98	3,95	3,19	2,51	3,33	1,89	2,69	1,77
cis-Cutárico	1,71	1,91	1,44	2,37	2,11	2,58	2,41	1,47	2,13	1,43
trans-Cutárico	0,86	0,66	0,46	0,74	0,78	2,47	0,52	0,44	0,61	0,39
trans-Fertárico	0,13	0,14	0,14	0,35	0,30	0,09	0,21	0,13	0,24	0,30
Estilbenos										
cis-Glucósido de resveratrol	0,22	0,23	0,22	0,27	0,30	0,29	0,21	0,17	0,23	0,18
trans-Glucósido de resveratrol	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d.	n.d	n.d	n.d	n.d
Cis-Resveratrol	0,13	n.d	n.d	n.d	n.d	0,18	n.d	n.d	n.d	n.d
Otros										
Tirosol	18,71	20,89	9,01	20,65	18,36	9,02	16,79	9,62	17,74	12,87
Triptofol	0,88	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,57	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Catequina	1,12	1,23	1,46	1,57	1,51	0,89	0,73	0,68	0,72	0,68

Vb: Vino base; V 9m: Vino espumoso de 9 m; V 12m: Vino espumoso de 12m; V 15m: Vino espumoso de 15 meses; V 18m: Vino espumoso de 18 meses.

Tabla 40. Concentración (mg/L) de los compuestos fenólicos determinados en el vino base y en los vinos espumosos elaborados con la variedad Garnacha.

	Garnacha		
	Vb	V 9m	V 12m
Ácidos hidroxibenzoicos			
Gálico	1,23	1,48	1,18
Protocatéquico	0,46	0,51	0,76
p-Hidroxibenzoico	0,03	0,01	0,01
Vainillínico	0,47	0,56	0,42
Siríngico	1,00	0,83	0,81
Ácidos hidroxicinámicos			
trans-Cafeico	2,56	3,51	2,94
cis-p-Cumárico	0,55	0,58	0,44
trans-p-Cumárico	1,45	1,80	1,45
Ésteres hidroxicinámicos			
cis-Caftárico	0,54	0,31	0,32
trans-Caftárico	10,64	6,84	9,74
cis-Cutárico	2,72	0,91	1,94
trans-Cutárico	0,89	1,64	0,64
trans-Fertárico	0,35	0,46	0,12
Estilbenos			
cis-Glucósido de resveratrol	n.d.	n.d.	n.d.
trans-Glucósido de resveratrol	n.d.	n.d.	n.d.
Cis-Resveratrol	0,13	0,24	0,12
Otros			
Tirosol	9,65	12,67	10,80
Triptofol	1,33	3,55	2,78
Catequina	n.d.	1,43	1,48

Vb: Vino base; V 9m: Vino espumoso de 9 m; V 12m: Vino espumoso de 12 meses.

De manera general, la concentración de los distintos grupos de compuestos fenólicos se resume a continuación.

3.7.1.1 Ácidos hidroxibenzoicos

En todos los vinos se han detectado los ácidos gálico, protocatéquico y p-hidroxibenzoico y en los vinos elaborados con uvas de variedades tintas se han detectado además los ácidos vainillínico y siríngico. Las mayores concentraciones se han detectado en los vinos 2 de la variedad Monastrell (de 0,12 a 1,66 mg/L) y los vinos de la variedad Garnacha (de 0,01 a 1,48 mg/L) mientras que en el resto de los vinos incluso en los elaborados con variedades tintas, se han encontrado concentraciones menores de 1,04 mg/L. Ibern-Gómez y col. (2000) han detectado en vinos espumosos de variedades blancas entre 1,8 y 2,21 mg/L de ácidos hidroxibenzoicos, es decir valores muy próximos a los aquí determinados.

3.7.1.2 Ácidos hidroxicinámicos

Se han detectado en los vinos los ácidos trans-cafeico, y el cis y trans-p-cumárico. El ácido trans-cafeico, es el que se ha encontrado en mayor concentración en todos los vinos, entre 0,08 y 3,5 mg/L. La concentración más elevada de este compuesto corresponde a los vinos elaborados con la variedad Garnacha. Se ha detectado la presencia de los dos isómeros del ácido p-cumárico, con una concentración comprendida entre 0,06 y 0,60 mg/L. La concentración de cada uno de estos dos isómeros es prácticamente la misma en los vinos pertenecientes a la misma variedad, con excepción de los vinos rosados elaborados con la variedad Garnacha, en los que la concentración del isómero trans es mayor que la del isómero cis. Somers y col., (1987), indican sin embargo, que los conformeros cis de los derivados hidroxicinámicos, son mucho más inestables y por tanto, minoritarios en los vinos. Otros autores (Ibern-Gómez y col., 2000; Betés-Saura y col., 1996), no han detectado el isómero cis del ácido p-cumárico, ni en vinos base ni en espumosos elaborados con variedades de uvas blancas. El ácido trans-ferúlico, otro de los ácidos hidroxicinámicos, no se ha determinado en ninguno de los vinos analizados. Algunos autores indican que de los ácidos hidroxicinámicos de los vinos blancos, el ferúlico es el que se encuentra en

cantidades menores (Riberau-Gayón y col., 2000), aunque de Rosa (1988), señala que es uno de los más importantes en vinos tintos. En vinos espumosos, Ibern-Gómez y col., (2000), encuentran este ácido en muy baja concentración. Los ácidos hidroxicinámicos se encuentran principalmente en la pulpa de las uvas, por tanto, independientemente de que haya o no maceración con las partes sólidas, la concentración en vinos blancos y tintos debería ser muy parecida de no ser que se tratara de variedades tintoreras.

3.7.1.3 Ésteres hidroxicinámicos

Representan el grupo de compuestos fenólicos más importante, desde el punto de vista cuantitativo, de los vinos estudiados, excluyendo al tirosol en los vinos elaborados con uvas tintas. Los vinos espumosos Parellada, y los elaborados con mezclas de variedades blancas, tienen mayor concentración de estos compuestos, que los elaborados con variedades tintas. El trans-caftárico es el éster hidroxicinámico, que se encuentra en mayor concentración en todos los vinos, entre 0,93 y 10 mg/L, en los vinos elaborados con variedades tintas, y entre 9,3 y 30,11 mg/L en los elaborados con variedades blancas. El isómero cis-caftárico, se encuentra en mucha menor proporción en todos los vinos. El cis-cutárico, es el segundo éster hidroxicinámico que aparece en mayor concentración en los vinos. La forma trans de este ácido se ha detectado en menor concentración. Aunque energéticamente los isómeros cis son más inestables, el hecho de que aparezcan en los vinos indica que hay enzimas implicadas en la formación de estos compuestos con mayor afinidad hacia la producción de estos isómeros.

Aunque no se ha detectado como ya se ha indicado, el ácido ferúlico libre en ninguno de los vinos analizados, se ha comprobado la presencia en el vino de compuestos derivados de éste (apartado 3.3). De todos ellos, el trans-fertárico, es decir el éster tartárico del ácido ferúlico, se ha detectado y cuantificado en todos los vinos, aunque en baja concentración., entre 0,09 y 0,3 mg/L.

3.7.1.4 Estilbenos

Se han detectado en los vinos, el isómero cis de resveratrol y los dos isómeros correspondientes a las formas glucosiladas. En los vinos elaborados con la variedad de uva blanca Parellada se han detectado los tres compuestos en concentraciones bastante

similares entre sí y comprendidas entre 0,12 y 0,75 mg/L. En el vino Tipus, sólo se ha detectado el cis-glucósido de resveratrol en los vinos base, y no en los espumosos. En general es mayor el contenido de las formas glucosiladas que de las formas libres Goldberg y col., (1995), en más de 600 vinos que analizaron, determinaron en muy pocos el cis-resveratrol libre, indican que la forma glucosilada se encuentra fundamentalmente en los hollejos y que las formas libres se producirían por hidrólisis de estas durante la fermentación.

En los vinos elaborados con la variedad Garnacha se ha detectado la presencia del cis-resveratrol, pero no de las formas glucosiladas, a pesar de que estos vinos están elaborados en rosado y por tanto se ha producido durante un corto periodo de tiempo la maceración con los hollejos. El hecho de que sólo aparezca la forma libre, podría ser debido a que las formas glucosiladas, principalmente localizadas en los hollejos (Goldberg, 1995), además de encontrarse en baja concentración, durante la el tiempo de maceración, podrían hidrolizarse, debido a que estos compuestos estarían en contacto con diferentes enzimas hidrolíticas que se habrían podido liberar por la rotura de las bayas durante la prensada.

Los valores de estos compuestos detectados en todos los vinos estudiados, son en general menores que los que han descrito otros autores en vinos. Este grupo de compuestos se ha determinando en los vinos en un amplio rango de concentraciones (Lamuela-Raventós y col., 1995; Goldberg y col., 1996 a y b; Sato y col., 1997; Dietrich y col., 1999; Ribeiro de Lima y col., 1999, etc). Probablemente el método de análisis con etapa previa de extracción o no, es una de las razones posibles que algunos autores (Goldberg y col., 1999), atribuyen para explicar esta gran variación .

3.7.1.5 Otros compuestos

El tirosol es el compuesto fenólico de los analizados que aparece en mayor concentración en los vinos elaborados con las variedades Trepát, Monastrell y Garnacha, y el segundo en importancia después del trans-caftarico en los vinos espumosos de la variedad Parellada, y en los vinos base y espumosos Tipus. Se ha encontrado en concentraciones entre 7 y 19 mg/L.

El triptofol se ha detectado en los vinos en menor concentración que el tirosol. Se ha detectado en todos los vinos base y en los espumosos elaborados con las variedades Trepát, Garnacha, y Parellada, y sólo en los vinos base elaborados con Monastrell y en el vino base Tipus, pero no sus respectivos vinos espumosos. La concentración de este compuesto está comprendida entre 0,57 y 3,23 mg/L. Los valores más altos se han detectado en los vinos elaborados con la variedad Garnacha.

El tirosol y el triptofol, son los únicos compuestos fenólicos analizados, que se forman durante la fermentación alcohólica, a partir de los aminoácidos tirosina y triptófano respectivamente. Se ha encontrado una relación entre la concentración de estos compuestos y la maceración con los hollejos (Singleton y Trousdale, 1983), así como con la cepa de levadura (Barcenilla y col., 1989).

La catequina se ha detectado exclusivamente en los vinos elaborados con variedades tintas, con excepción del vino base de la variedad Garnacha, en un rango de concentración comprendido entre 0,70 y 1,13 mg/L.

Algunos autores han demostrado la importancia de la maceración en la extracción de algunos compuestos fenólicos al vino, entre los que se encontrarían no sólo compuestos flavonoides de los hollejos, sino también otros compuestos mayoritarios de la pulpa, como los ácidos hidroxicinámicos. Así, Günata y col., (1986) y Cleynier y col., (1989), han comprobado que tras una maceración pelicular de 4 horas, la concentración de los ácidos hidroxicinámicos aumenta un 20 %, y la de algunos compuestos flavonoídeos, era tres veces más que sin maceración.

La existencia de mayores concentraciones de catequina en los vinos espumosos elaborados con la variedad Garnacha que en el vino base del que proceden, puede deberse a que este compuesto puede encontrarse en el vino base unido al ácido gálico bajo diversas formas como la galocatequina, 3-galato de catequina, y 3-galato de galocatequina descritas por Piretti y col. (1976) y Lee y Jaworski (1990) y liberarse durante la segunda fermentación o el envejecimiento.

3.7.2 Influencia de diferentes factores en los compuestos fenólicos de bajo peso molecular de los vinos.

Para conocer la posible existencia de relaciones entre los compuestos fenólicos de bajo peso molecular detectados en los vinos y las distintas variables estudiadas (condiciones de cultivo, variedad de uva empleada, y tiempo de envejecimiento con las levaduras), se ha aplicado el análisis de varianza (ANOVA) mezclando las interacciones con el término del error, a los datos de los vinos de las variedades Parellada, Trepát, Monastrell y Garnacha, así como a los de los espumosos que hemos denominado Tipus, elaborados con mezcla de variedades de uvas blancas. Todos estos vinos están descritos en los apartados 2.1.2, 2.1.3, y 2.1.4.

El resultado de la aplicación de esta técnica estadística, se resume en la **tabla 41**, en la que se indica la existencia o no de diferencias significativas debidas a estas variables en los distintos compuestos fenólicos de bajo peso molecular determinados.

3.7.2.1 Influencia de las condiciones de cultivo en la composición de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular de los vinos espumosos elaborados con la variedad Parellada.

Como se puede comprobar en la **tabla 41**, algunos de los compuestos fenólicos están influidos significativamente por las condiciones de cultivo. Estos compuestos son el ácido gálico, el ácido trans cafeico, los dos isómeros del ácido cumárico, los ésteres hidroxicinámicos trans y cis-caftárico, y el cis-cutárico, así como los estilbenos cis-resveratrol, y el glucósido correspondiente.

Tabla 41. Variables que influyen en la concentración de los compuestos fenólicos en los vinos estudiados.

	Condiciones de cultivo	Variedad	Envejecimiento (Vbase-9m)	Envejecimiento (9m-18m)
Ácidos hidroxibenzoicos				
Gálico	*	*	n.s.	n.s.
Protocatéquico	n.s.	*	n.s.	n.s.
p-Hidroxibenzoico	n.s.	*	n.s.	n.s.
Vainillínico	n.s.	*	n.s.	n.s.
Siríngico	n.s.	*	n.s.	n.s.
Ácidos hidroxicinámicos				
trans-Cafeico	*	*	n.s.	n.s.
cis-p-Cumárico	*	*	*	n.s.
trans-p-Cumárico	*	*	n.s.	n.s.
Ésteres hidroxicinámicos:				
cis-Caftárico	*	*	n.s.	n.s.
trans-Caftárico	*	*	n.s.	n.s.
cis-Cutárico	*	*	n.s.	n.s.
trans-Cutárico	n.s.	*	n.s.	n.s.
trans-Fertárico	n.s.	*	n.s.	n.s.
Estilbenos:				
cis-Glucósido de resveratrol	*	*	n.s.	n.s.
trans-Glucósido de resveratrol	n.s.	*	n.s.	n.s.
Cis-Resveratrol	*	*	n.s.	n.s.
Otros:				
Tirosol	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Triptofol	n.s.	*	*	n.s.
Catequina	n.s.	*	n.s.	n.s.

* : Si hay diferencias significativas. n.s: No hay diferencias significativas.

En la **figura 34** se muestran los valores medios y la desviación estandar de estos compuestos en los vinos base y los espumosos elaborados con las uvas A y B de la variedad Parellada, respectivamente. Con excepción de los ácidos cis y trans caftarico, estos compuestos se encuentran en mayor concentración en los vinos elaborados con uvas procedentes de viñedos sobreexplotados (vinos A) que en los vinos de uvas procedentes de viñedos sometidos a las condiciones tradicionales de cultivo.

Las diferencias de concentración encontradas en los compuestos fenólicos de los dos tipos de vinos espumosos estudiados, se muestran en la **figura 34**. En ella, se representa en diagrama de barras la concentración media en mg/L, y la desviación típica, de los compuestos fenólicos influenciados significativamente por las condiciones de cultivo, en los vinos espumosos Parellada B (PB), es decir en los que proceden de viñas cultivadas según prácticas de cultivo tradicionales, y en los espumosos Parellada A (PA), es decir, en los procedentes de viñedos sometidos a condiciones de sobreexplotación, todos ellos correspondientes a 9, 12, 15 y 18 meses de envejecimiento. Estas diferencias en la composición fenólica pueden tener implicaciones en la calidad de los vinos, ya que está ampliamente documentado (Singleton y col., 1984; Cilliers y Singleton, 1989; Cheynier y col., 1983; Cheynier y col., 1990 etc) que los ácidos y especialmente los ésteres hidroxicinámicos son los principales precursores de las reacciones de pardeamiento enzimático. Además los ácidos cinámicos junto con los benzoicos están implicados en la aparición de tonos amarillos más intensos en los vinos blancos (González y col., 1990). Esto coincide con que los valores de la intensidad de color calculada por la suma de las absorbancias a 420 y 520 nm (tabla 13), Parellada A (0,085 de valor medio), que en los Parellada B (0,067 de media), es decir, los primeros tienen una coloración amarilla más intensa.

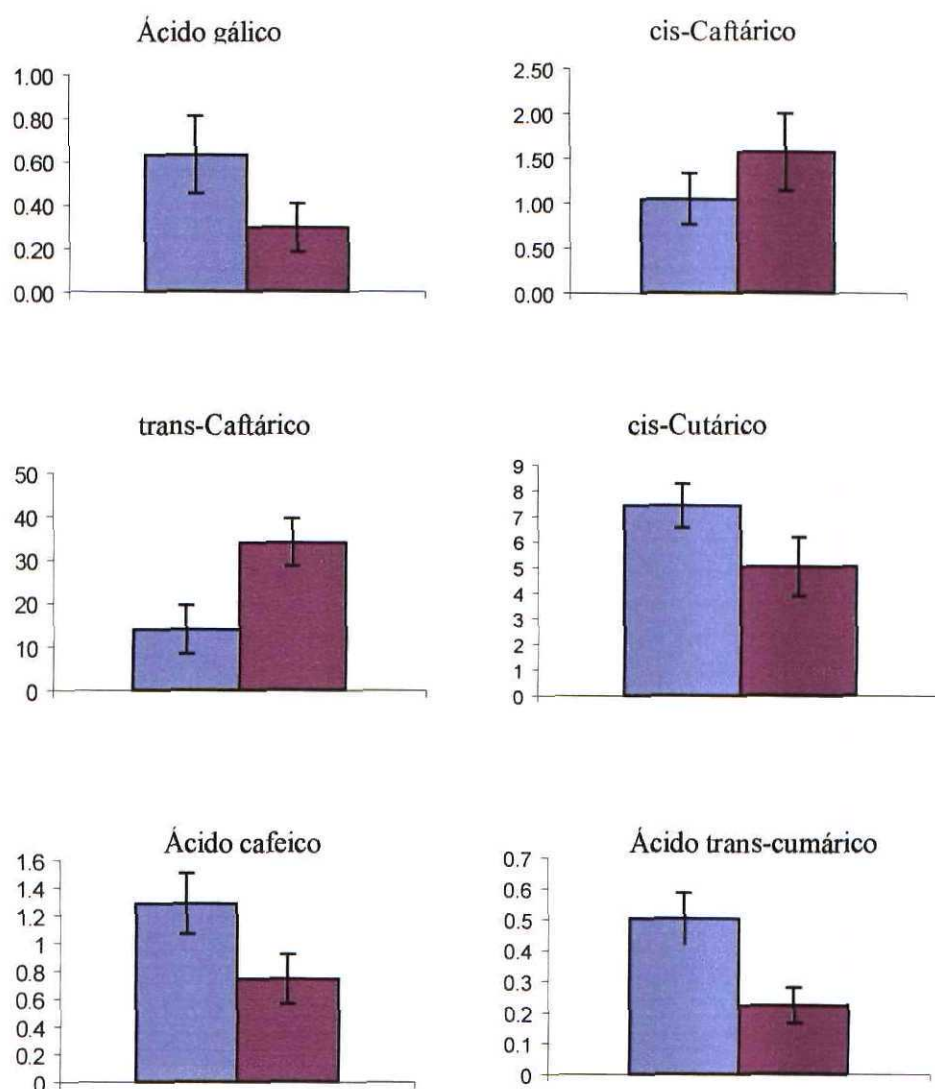


Figura 34. Valores medios de concentración (mg/L) y (\pm) desviación típica, de los compuestos fenólicos influidos significativamente por las condiciones de cultivo, en los vinos espumosos Parellada.

PA ■ PB ■

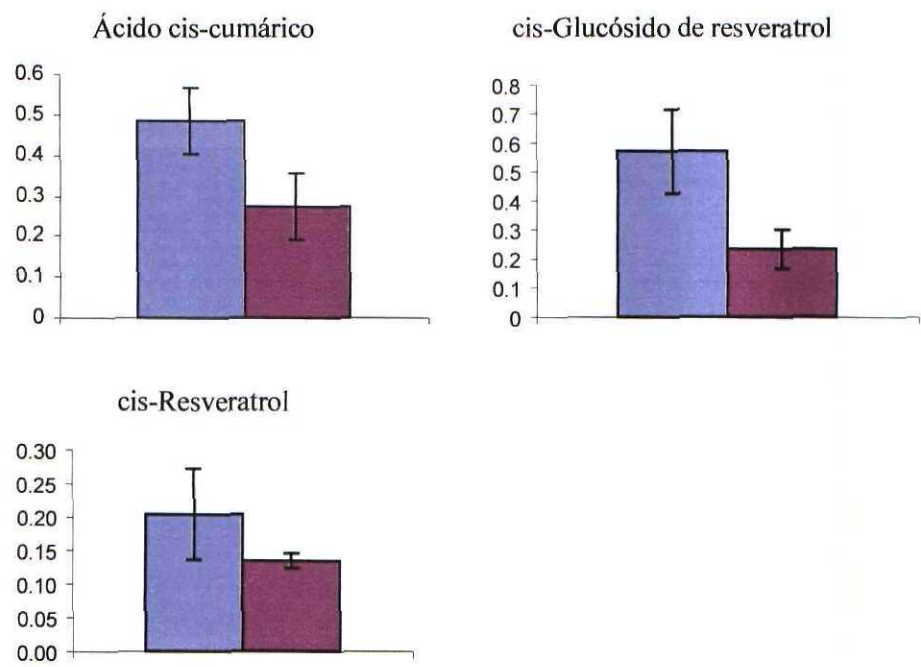


Figura 34. (Continuación).



3.7.2.2 Influencia de la variedad de uva empleada en la composición fenólica de los vinos.

Como se muestra en la **tabla 41**, la variedad de uva empleada en la elaboración de los vinos influye en la concentración de todos los compuestos fenólicos determinados, con excepción del tirosol.

Para comprobar las mayores causas de variación de los compuestos fenólicos se ha llevado a cabo el análisis de componentes principales con los datos correspondientes a la concentración de los compuestos fenólicos, en todos los vinos analizados. Se han obtenido cuatro componentes principales. Las dos primeras explican un 55,83 % de la varianza total y están correlacionadas positivamente con el cis-caftárico y el cis y el trans-cutárico. La tercera y cuarta componentes principales explican hasta un 81,88 % de la varianza y se correlacionan de forma negativa con los ácidos vainillínico y siríngico.

Se puede observar (**Figura 35**) que la variable canónica 1, separa a los vinos elaborados con las variedades tintas, es decir Trepát, Monastrell y Garnacha, de los elaborados con variedades blancas. La variable canónica 2, tiene valores positivos en los vinos elaborados con Trepát, Parellada A, y Garnacha. Los valores más altos corresponden a los vinos elaborados con esta última variedad, por tanto estos tres grupos de vinos, tienen las concentraciones más altas de los ácidos trans-cafeico y trans-cumárico. Los vinos elaborados con las otras dos variedades, Monastrell, Parellada B, y los vinos mezcla de variedades blancas, tienen valores de la componente principal 2 negativos, y por tanto, valores más bajos en la concentración de estos ácidos.

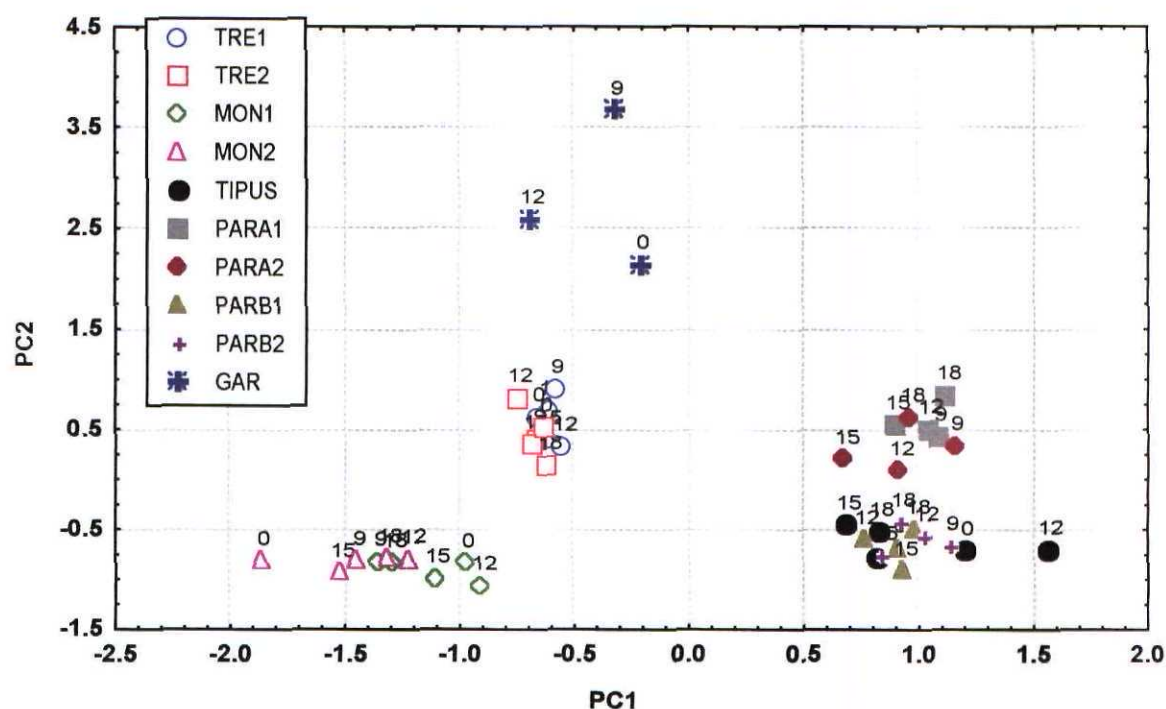


Figura 35. Representación de todos los vinos estudiados en el plano definido por las dos primeras componentes principales, a partir de los datos de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular.

3.7.2.3 Influencia del tiempo de envejecimiento

Como se puede comprobar en la **tabla 41**, ninguno de los compuestos fenólicos analizados está influido significativamente por el tiempo de envejecimiento entre los 9 y 18 meses. Estos resultados están de acuerdo con Ribereau-Gayón y col., (2000), que afirman que por muy largo que sea el tiempo de permanencia del vino de Champagne en contacto con las levaduras, el vino se conserva y envejece perfectamente, sin sufrir ningún tipo de alteración. Ibern-Gómez y col., (2000), comprobaron que se producía un pardeamiento de los vinos espumosos después de 15 meses de envejecimiento con las levaduras. Atribuyen este hecho a la oxidación de compuestos fenólicos, especialmente los trans y cis-caftarico, tras su liberación de las paredes de las levaduras, en las que se encontrarían adsorbidos, como consecuencia del proceso de autólisis. Indican que dependiendo de la variedad de uva, los vinos son más o menos susceptibles, y

comprueban que la variedad Chardonnay es más susceptible a la oxidación que los vinos obtenidos por mezcla de variedades típicas del Penedés

3.7.3 Análisis cluster

Para comprobar si se producen agrupamientos entre los distintos vinos a través de su composición en compuestos fenólicos de bajo peso molecular, se ha aplicado el análisis de conglomerados a los datos de los compuestos fenólicos determinados tanto en los vinos base, como en los vinos espumosos. Se ha utilizado la distancia euclídea al cuadrado como medida de la semejanza entre las muestras a partir de las variables estandarizadas, y el método de Ward para la fusión de los grupos. Como puede comprobarse en el dendrograma resultante de la aplicación de este análisis y que se muestra en la **figura 36**, hay dos grandes grupos de vinos, uno de ellos formado por los vinos elaborados con variedades blancas, y un segundo en el que se incluyen los vinos elaborados con variedades tintas. Dentro del primer grupo se pueden observar a su vez otros dos agrupamientos, los vinos espumosos Parellada B por un lado, y otro subgrupo en el que aparecen los vinos Parellada A, más próximos al vino base y a los vinos espumosos Tipus, elaborados con mezcla de variedades blancas. En el segundo gran grupo, se pueden hacer claramente dos subgrupos bastante distanciados, el primero englobaría a los vinos elaborados con las variedades Trepát y Monastrell, que tienen en común que han sido vinificados en blanco, y el otro corresponde a los vinos elaborados con la variedad Garnacha, y que han sido vinificados en rosado. Por tanto, el dendrograma pone de manifiesto, la influencia de la variedad de uva empleada y de las condiciones de cultivo, ya que los vinos Parellada A, se separan de los Parellada B, y no se observa ningún agrupamiento debido al tiempo de envejecimiento, como ya se ha indicado en la tabla 41.

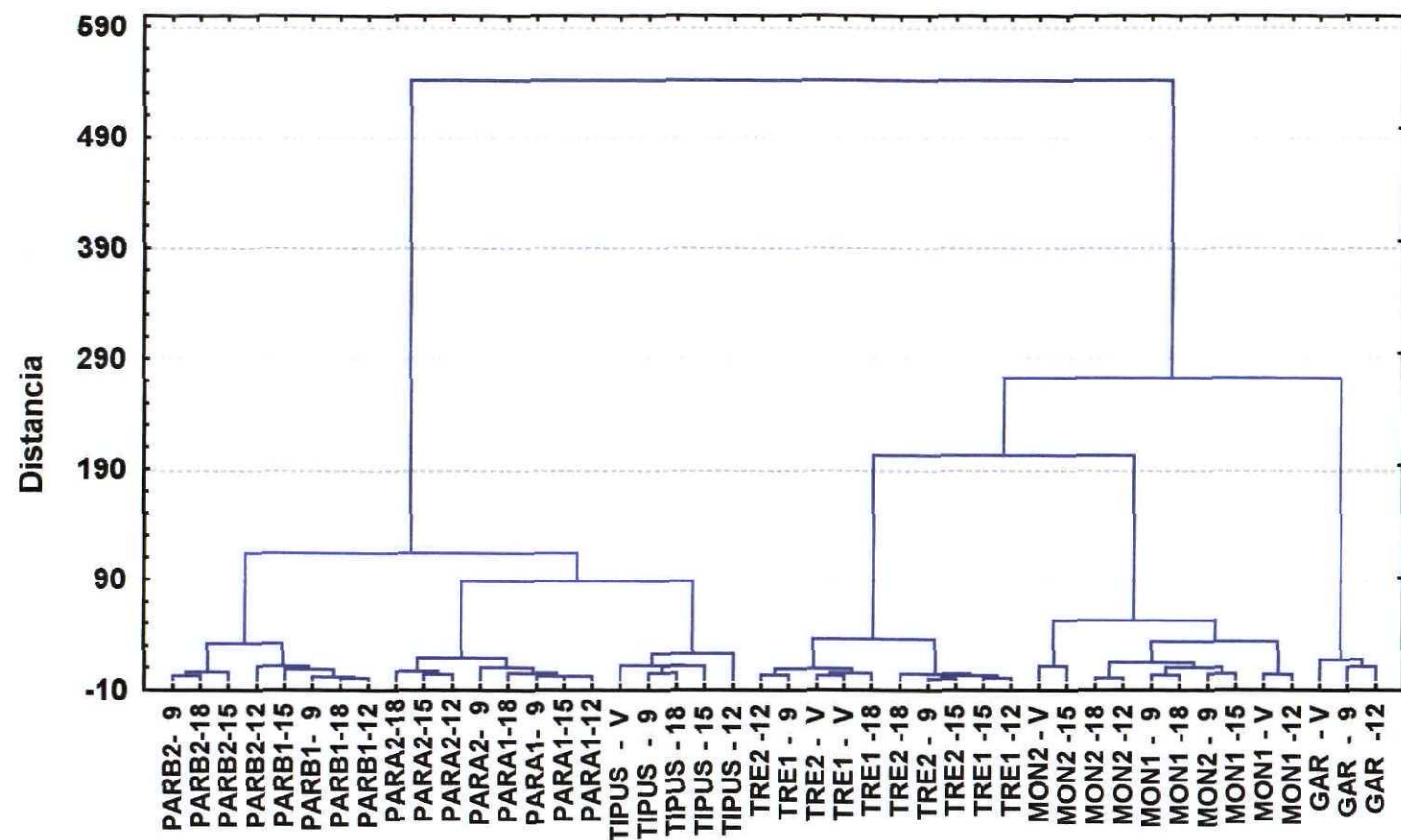


Figura 36. Dendrograma de los vinos de distinto tiempo de envejecimiento y elaborados con diferentes variedades de uvas, a partir de los datos de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular. PARA1: Vinos A1 de la variedad Parellada; PARA2: Vinos A2 de la variedad Parellada; TIPUS: Vinos Tipus; TRE1: Vinos 1 de la variedad Trepas; TRE2: Vinos 2 de la variedad Trepas; MON1: Vinos 1 de la variedad Monastrell; MON2: Vinos 2 de la variedad Monastrell; GAR: Vinos de la variedad Garnacha. V: Vinos base. 9, 12, 15, 18: meses de envejecimiento.

3.8 Compuestos antociánicos en los vinos base y espumosos elaborados con diferentes variedades de uvas tintas.

Se han analizado por HPLC en fase inversa, con detección de diodos alineados (DAD) en las condiciones descritas en el apartado 2.5 de Materiales y Métodos, los compuestos antociánicos de los vinos base y vinos espumosos elaborados con las variedades Trepát, Monastrell y Garnacha, que se describen en el apartado 2.1.3 de Materiales y Métodos.

Como resultado del análisis de todos los vinos estudiados, se ha confirmado la presencia de 23 compuestos distintos. En algunos casos no ha sido posible elucidar totalmente su estructura, y se muestran incluidos dentro del grupo en el que basándonos en sus características espectrales, cromatográficas (tiempos de retención), o por la información bibliográfica disponible, presentan mayores semejanzas, y hace pensar que pertenezcan a alguno de estos grupos sugeridos.

En la **tabla 42** se muestran los antocianos analizados en los vinos estudiados según su orden de elución con las condiciones cromatográficas empleadas. Además aparece el número correspondiente a cada pico en los cromatogramas.

Los antocianos analizados en los vinos se pueden incluir por sus características químicas en cinco grupos, que son el de glucósidos, glucósidos dehidroxilados, complejos antociano-procianidina, glucósidos acetilados, glucósidos cumárilicos, y antocianos complejos. La Vitisina A, presenta características químicas peculiares que hace que no pueda ser incluida en ninguno de estos grupos.

a-Glucósidos: A este grupo corresponderían las diferentes antocianidinas (parte aglucona de la molécula de antociano), unidas a la glucosa. Se incluyen dentro del mismo el delfinidín, cianidín, malvidín, petunidín, y peonidín glucósido, (picos del 1-5). Su identificación se ha basado en la comparación de sus características espectrales y tiempos de retención en las mismas condiciones de análisis que los vinos estudiados, con patrones comerciales.

Tabla 42 . Relación de antocianos identificados y vinos en los que se han detectado.

nº de pico	Grupo	Compuestos	Vinos		
			Trepat	Monastrell	Garnacha
1	Glucósidos	Delfinidín glucósido	*	nd	*
2		Cianidín glucósido	*	nd	*
3		Petunidín glucósido	*	*	*
4		Peonidín glucósido	*	*	*
5		Malvidín-3-glucósido	*	*	*
6	Glucósidos dehidroxilados	Luteolinidina	*	*	nd
7		Fisetinidina	*	*	*
8		Diosmetinidina	n.d	nd	nd
9		Vitisina A	*	*	*
10	Complejos de antocianos y procianidinas	Complejo antociano-procianidina (I)	*	nd	*
11		Complejo malvidín-catequina	*	*	*
12		Complejo Antociano-procianidina (II)	nd	*	*
13		Complejo Antociano-Procianidina (III)	nd	*	nd
14	Glucósidos acetilados	Petunidín acetil glucósido	*	nd	nd
15		Peonidín acetil glucósido	*	*	*
16		Malvidín acetil glucósido	*	*	*
17	Glucósidos cumarílicos	Malvidín caferoil glucósido	*	nd	*
18		Peonidín cumaril glucósido	*	nd	*
19		Malvidín cumaril glucósido	*	*	*
20	Antocianos complejos	Derivado malvidín-glucosa	*	*	*
21		Derivado de alto Peso molecular (I)	*	*	*
22		Derivado de alto Peso molecular (II)	nd	nd	*
23		Derivado de alto Peso molecular (III)	*	nd	*

b-Glucósidos dehidroxilados: Se caracterizan por la falta de un grupo hidroxilo en el anillo A de la molécula de antociano, que ha sido sustituido por un hidrógeno. Se incluyen en este grupo la luteolinidina (pico 6) y fisetinidina (pico 7) cuando la sustitución del grupo -OH en el C3 o en el C5 de la cianidina, y la diosmetinidina (pico 8) cuando es en el C3 de la peonidina.

c-Complejos de antocianos y procianidinas : Corresponden a este grupo diferentes antocianos, que estarían unidos a distintos tipos de catequinas. Incluyen a los compuestos que hemos llamado, antociano-procianidina (I), malvidín-catequina, y antociano-procianidina (II), y (III), correspondientes a los picos 10, 11, 12, y 13 respectivamente. Los picos 11, y 12, corresponderían a uniones entre el malvidín-3-glucósido, y la catequina a través de un puente de etilo que daría lugar a dos dímeros diferentes, según lo establecido por algunos autores (Dallas y col., 1996; Francia-Aricha y col., 1997). A partir de estos por polimerizaciones sucesivas con otras moléculas de distintos tipos de catequinas, se irían formando los otros derivados, picos 10 y 13. Todos estos compuestos se caracterizan porque su máximo de absorbancia se encuentra desplazado hacia la región del azul, y aparecen con mayor frecuencia en vinos envejecidos (Revilla y col., 1999).

d-Glucósidos acetilados: Este grupo corresponde a los antocianos en los que la glucosa está esterificada con un ácido orgánico (acético). Incluye al petunidín, peonidín y malvidín acetil glucósido, (picos 14, 15, y 16). Revilla y col., (1999), determinan este tipo de compuestos principalmente en vinos jóvenes, e indican que se van perdiendo durante el envejecimiento.

e-Glucósidos cumarílicos: Corresponden a los antocianos en los que la glucosa está esterificada con un ácido fenólico (cafeico, o cumárico). Se incluirían en este grupo el malvidín caferoil glucósido, así como el peonidín y el malvidín cumaril glucósido, (picos 17, 18, y 19). Al igual que los glucósidos acetilados, parecen ser más característicos de vinos jóvenes y se perderían durante el transcurso del envejecimiento.

f-Antocianos complejos. En este grupo se han incluido moléculas complejas de mayor peso molecular y menos polares que eluyen a los mayores tiempos de retención. Dentro

de este grupo se incluirían el derivado de malvidín-glucosa, y los derivados de alto peso molecular (I) , (II), y (III), (picos 20, 21, 22, y 23 respectivamente). Este grupo de compuestos podrían corresponder a distintas condensaciones del malvidín-3-glucósido u otros antocianos, fundamentalmente derivados cumarílicos. Es un grupo de compuestos que no suele aparecer en los vinos, Revilla y col, 1999, encuentran un pico perteneciente a este grupo, cuando se analizan vinos muy envejecidos. El compuesto que encuentran ellos se diferencia del peonidín-3-(6-cumaroil) glucósido en que su λ max presenta una desviación hipsocrómica de 15 unidades, e indican que podría corresponder al compuesto aislado por Fulcrand y col, (1996), del retenido procedente de la filtración del vino por membranas.

La **vitisina A** (pico 9), no esta incluida en ninguno de estos grupos porque presenta características distintas. Este pico, junto con el del malvidín-3-glucósido, es uno de los mayoritarios en todos los vinos estudiados. Su espectro de UV con una λ max de 512, así como el orden de elución en el cromatograma hace pensar que se trata de este compuesto, aislado por Bakker y col., (1997), en vinos de Oporto envejecidos. Fulcrand y col., (1998), encuentran un compuesto con estas características en una solución sintética, e indican que se formaría por condensación entre el malvidín-3-glucósido y el ácido pirúvico, y lo llaman derivado pirúvico del malvidín-3-glucósido. Recientemente Revilla y col., (1999), han detectado su presencia con el empleo acoplado de HPLC y detector de espectrometría de masas, e indican que difiere del malvidín-3-glucósido en 68 unidades de masa. Su formación por tanto, actualmente sigue sin conocerse con certeza.

3.8.1 Concentración de antocianos en los vinos base y espumosos elaborados con diferentes variedades de uvas tintas.

En la **tabla 43**, se muestran los valores de concentración en $\mu\text{g/L}$, de los distintos antocianos analizados en los vinos base y en los espumosos elaborados con las variedades Trepát, Monastrell y Garnacha. Los aspectos más destacados se comentan a continuación.

Tabla 43. Concentración ($\mu\text{g/L}$) de los distintos compuestos antocianos en los vinos base y vinos espumosos analizados.

n°		Trepát				Monastrell				Garnacha		
		VB	V9m	V12m	V18m	VB	V9m	V12m	V18m	VB	V9m	V12m
	Glucósidos											
1	Delfinidín glucósido	6,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	12,5	n.d.	n.d.
2	Cianidín glucósido	3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	21,1	n.d.	n.d.
3	Petunidín glucósido	175,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	81	68	n.d.	35,4	91,2	13,9
4	Peonidín glucósido	119,4	18	16	83	30,9	20,8	25,9	23,0	11,7	63	5,2
5	Malvidín-3-glucósido	661,3	157	140,9	59,9	243,6	163,6	230,1	166,7	274,4	662,1	78,9
	Glucósidos dehidroxilados											
6	Luteolinidina	4,1	4,4	2,9	n.d.	21,7	8,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
7	Fisetinidina	9,3	8	7,3	7,5	15,4	14,6	16,5	17,0	8,5	n.d.	n.d.
8	Diosmetinidina	trazas	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Complejos antocianos-procianidinas											
10	Complejo antociano-procianidina (I)	5,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	74,8	n.d.	n.d.
11	Complejo malvidín-catequina	11	4,3	5,7	n.d.	28,1	9,1	10,6	8,4	30,7	10,3	15,9
12	Complejo Antociano-procianidina (II)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,6	n.d.
13	Complejo Antociano-Procianidina (III)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	8,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Glucósidos acetilados											
14	Petunidín acetil glucósido	5,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
15	Peonidín acetil glucósido	4,3	n.d.	n.d.	n.d.	5,4	4,5	5,5	n.d.	10,8	9,7	n.d.
16	Malvidín acetil glucósido	27,6	6,5	5	n.d.	18,2	10,6	13,1	71	17,2	44	n.d.
	Glucósidos cumarílicos											
17	Malvidín caferoil glucósido	9,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7,1	n.d.	n.d.
18	Peonidín cumaril glucósido	6,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	12,1	22,8	n.d.
19	Malvidín cumaril glucósido	13,7	n.d.	n.d.	n.d.	5	3,6	5,3	7	28,7	47,4	n.d.
	Antocianos complejos											
20	Derivado malvidín-glucosa	10,8	5,5	5,9	n.d.	4	6	6	6	23,7	38,9	67,6
21	Derivado de alto Peso molecular (I)	21,8	5,2	n.d.	n.d.	6,9	6,4	5	5	11,7	21,6	n.d.
22	Derivado de alto Peso molecular (II)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	27,4	71,2	n.d.
23	Derivado de alto Peso molecular (III)	10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	18,1	14,4	116,5
	Otros											
9	Vitisina A	26,6	14,7	13,5	8,6	49,4	24,8	23,4	19,4	61,2	66,7	52,7

3.8.1.1 Glucósidos

Los glucósidos, representan el grupo de compuestos antocianos cuantitativamente más importante. En los vinos estudiados, se encuentran en un rango de concentración comprendido entre 910 y 1260 $\mu\text{g/L}$, los valores más altos corresponden a los vinos base, mientras que los vinos espumosos tienen valores más bajos. El Malvidín-3-glucósido es el más abundante en todos ellos. En el vino base de la variedad Monastrell solo se han detectado el malvidín y el peonidín glucósido. En los vinos base de las variedades Trepát y Garnacha se han detectado los cinco glucósidos pero no todos se han encontrado en los vinos espumosos.

3.8.1.2 Glucósidos dehidroxilados

Los tres glucósidos dehidroxilados luteodinidina, fisetinidina y diosmetinidina, aparecen en el vino base y en los espumosos elaborados con la variedad Trepát, aunque la diosmetinidina, únicamente ha sido detectada en el vino base, y no se ha podido cuantificar. Ni en el vino base Garnacha, ni en los espumosos correspondientes, se ha detectado luteolinidina. En estos últimos tampoco se ha detectado fisetinidina. Todos ellos, aparecen en muy baja concentración, y la suma de las concentraciones determinadas para los distintos compuestos pertenecientes a este grupo está comprendida entre 8,5 y 93,4 $\mu\text{g/L}$, que es la mayor concentración determinada en los vinos elaborados con la variedad Monastrell.

3.8.1.3 Complejos antociano-procianidina

Los vinos elaborados con la variedad Garnacha presentan la mayor cantidad de compuestos pertenecientes al grupo antociano-procianidina, y la mayor concentración de todos los vinos analizados, la suma de los compuestos pertenecientes a este grupo es de 135,3 $\mu\text{g/L}$. Los vinos elaborados con las variedades Trepát y Monastrell, tienen concentraciones de este grupo de 26,3 y 75,9 $\mu\text{g/L}$ respectivamente.

3.8.1.4 Glucósidos acetilados

El peonidín y el malvidín acetil glucósido aparecen en los tres vinos base, sin embargo, ni en el vino base Monastrell ni en el Garnacha, aparece el pico correspondiente al petunidín acetil glucósido que tampoco ha sido detectado en ninguno de los vinos espumosos. El peonidín acetil glucósido no se ha detectado en los vinos espumosos elaborados con la variedad Trepát. En general los compuestos pertenecientes a este grupo se han encontrado en muy baja concentración, la más elevada de nuevo corresponde a los vinos elaborados con la variedad Garnacha, que sumando la concentración de todos los compuestos de este grupo es de 81,8 µg/L. Después se encuentran los vinos elaborados con Monastrell y Trepát en concentraciones de 64,4 y 48,7 µg/L, respectivamente.

3.8.1.5 Glucósidos cumarílicos

Los glucósidos cumarílicos, malvidín caferoil glucósido, así como el peonidín y malvidín cumaril glucósido, aparecen en los vinos base de las variedades Trepát y Garnacha, el malvidín cumaril glucósido, es el único representante de este grupo que aparece en el vino base de la variedad Monastrell. En los vinos espumosos, se ha detectado peonidín y malvidín cumaroil glucósido en los elaborados con Garnacha, en los Monastrell sólo se ha detectado el malvidín cumaroil glucósido, mientras que en los Trepát no se ha detectado ninguno de ellos. La suma de concentraciones de los compuestos pertenecientes a este grupo es de 118 µg/L para los vinos Garnacha y 30,2 y 21,6 µg/L., para los Trepát y Monastrell respectivamente.

3.8.1.6 Antocianos complejos

Este último grupo de compuestos está formado por los antocianos complejos y más apolares. Se han detectado en todos los vinos base, aunque en mayor concentración en los vinos de la variedad Garnacha, en los que además aparece el mayor número de compuestos incluidos en este grupo. La menor concentración en los vinos base, al igual que sucedía con los glucósidos cumarílicos, se ha encontrado en los elaborados con la variedad Monastrell que a su vez presentan el número más bajo de compuestos pertenecientes a este grupo. En los vinos espumosos se han detectado distintos

compuestos pertenecientes a este grupo, pero es sobre todo en los vinos espumosos Garnacha, en los que se han detectado mayor número de compuestos y en mayor concentración. Los valores encontrados para la suma de concentraciones de los diferentes compuestos de este grupo son de 410 µg/L para los vinos Garnacha, y de 59,3 y 48,6 µg/L, en los Trepát y Monastrell respectivamente.

3.8.1.7 Vitisina A.

La Vitisina A, es el compuesto cuantitativamente más importante después del Malvidín-3-glucósido. Aparece en todos los vinos base y en todos los vinos espumosos analizados. La concentración está comprendida entre 8,6 y 66,7 µg/L. La concentración más elevada la presentan los vinos de la variedad Garnacha.

Se podrían resumir las diferencias entre los tres vinos base, en que el vino Monastrell, presenta en general menos antocianos pertenecientes a los grupos de glucósidos, glucósidos acetilados, glucósidos cumárilicos, y antocianos de alto peso molecular. La variedad Trepát, al contrario, es la más rica en compuestos pertenecientes al grupo de glucósidos, glucósidos dehidroxilados, y glucósidos cumárilicos. Los vinos de la variedad Garnacha se caracterizarían fundamentalmente por presentar un mayor número y concentración de compuestos pertenecientes al grupo de complejos antociano-procianidina, así como de compuestos pertenecientes al grupo de antocianos de alto peso molecular. Los vinos espumosos, tienen menor concentración en general de todos los antocianos, excepto los vinos espumosos de la variedad Garnacha, especialmente los de 9 meses de envejecimiento, que tienen mayor concentración que el vino base de antocianos glucósidos, Vitisina A, complejos antociano-procianidina, glucósidos acetilados, glucósidos cumárilicos, y complejos antociano-procianidina. En los vinos espumosos la variedad Monastrell, este último grupo presenta pocas variaciones respecto al vino base.

3.8.2 Evolución de los compuestos antociánicos durante el envejecimiento del vino con las levaduras.

En las **figuras 37, 38 y 39**, se representan los cromatogramas correspondientes a los vinos base y los espumosos de 9, 12, y 18 meses de envejecimiento de los vinos elaborados con las variedades Trepát y Monastrell, y los espumosos de 9, y 12 meses, de los elaborados con la variedad Garnacha.

Como se puede comprobar en los cromatogramas, a los 9 meses se produce una disminución en la concentración de prácticamente todos los grupos de antocianos en los vinos procedentes de las variedades Trepát y Monastrell. Es importante resaltar que esta disminución parece ser mas acusada en los vinos Trepát, en los grupos de glicosidos, glucosidos acetilados, glucosidos cumarilicos y antocianos complejos, a pesar de que en el vino base se encuentran en mayor concentración que en el vino base Monastrell. Estos últimos vinos presentan sin embargo, una disminución mas acusada de glucosidos hidroxilados, que además se encontraban en mayor concentración, en el vino base de partida.

Una posible explicación de la disminución que experimentan todos estos grupos de antocianos durante los 9 primeros meses de envejecimiento del vino con las levaduras podría deberse a que se produzcan reacciones de hidrolisis química, como las que suceden en los vinos tranquilos durante el envejecimiento. Otra posible causa de la disminución en este tipo de compuestos durante este periodo de tiempo podría ser su adsorción a las paredes de la levadura. Algunos autores han dado esta explicación para dar respuesta a la disminución de algunos compuestos fenólicos que se produce durante el envejecimiento biológico de algunos vinos de la zona Jerez (Barón y col., 1997; Cortés y col., 1997; Fabios y col., 2000). Este tipo de adsorción a las paredes de las levaduras ha sido confirmada para otro tipo de compuestos como ésteres o ácidos grasos del vino (Lafon-Lafourcade y col, 1984; Herráiz, 1989).

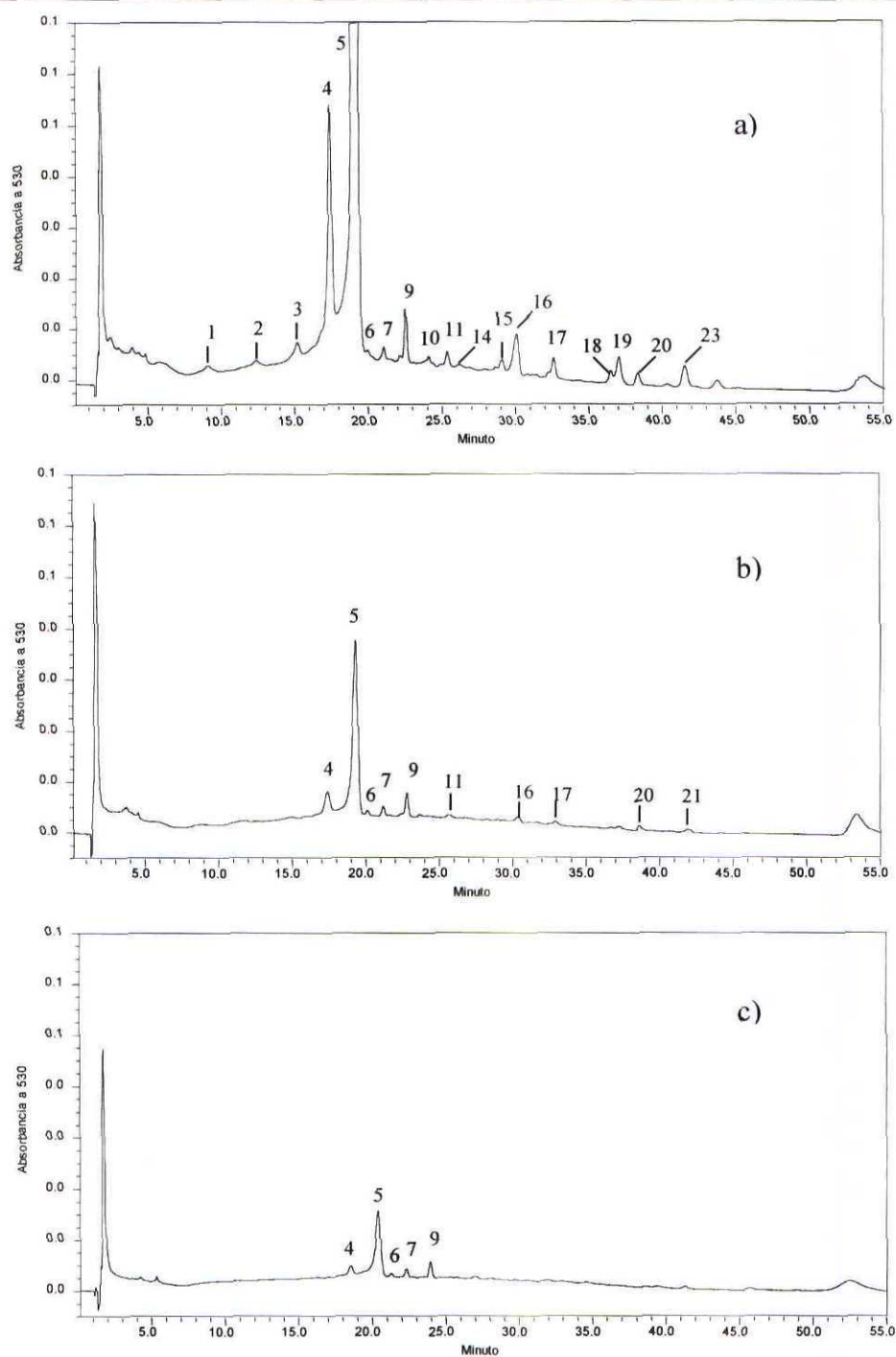


Figura 37. Cromatogramas correspondientes a los compuestos antociánicos analizados en los vinos elaborados con la variedad Trepát. a) Vino base; b) Vino espumoso de 9 meses; c) Vino espumoso de 18 meses.

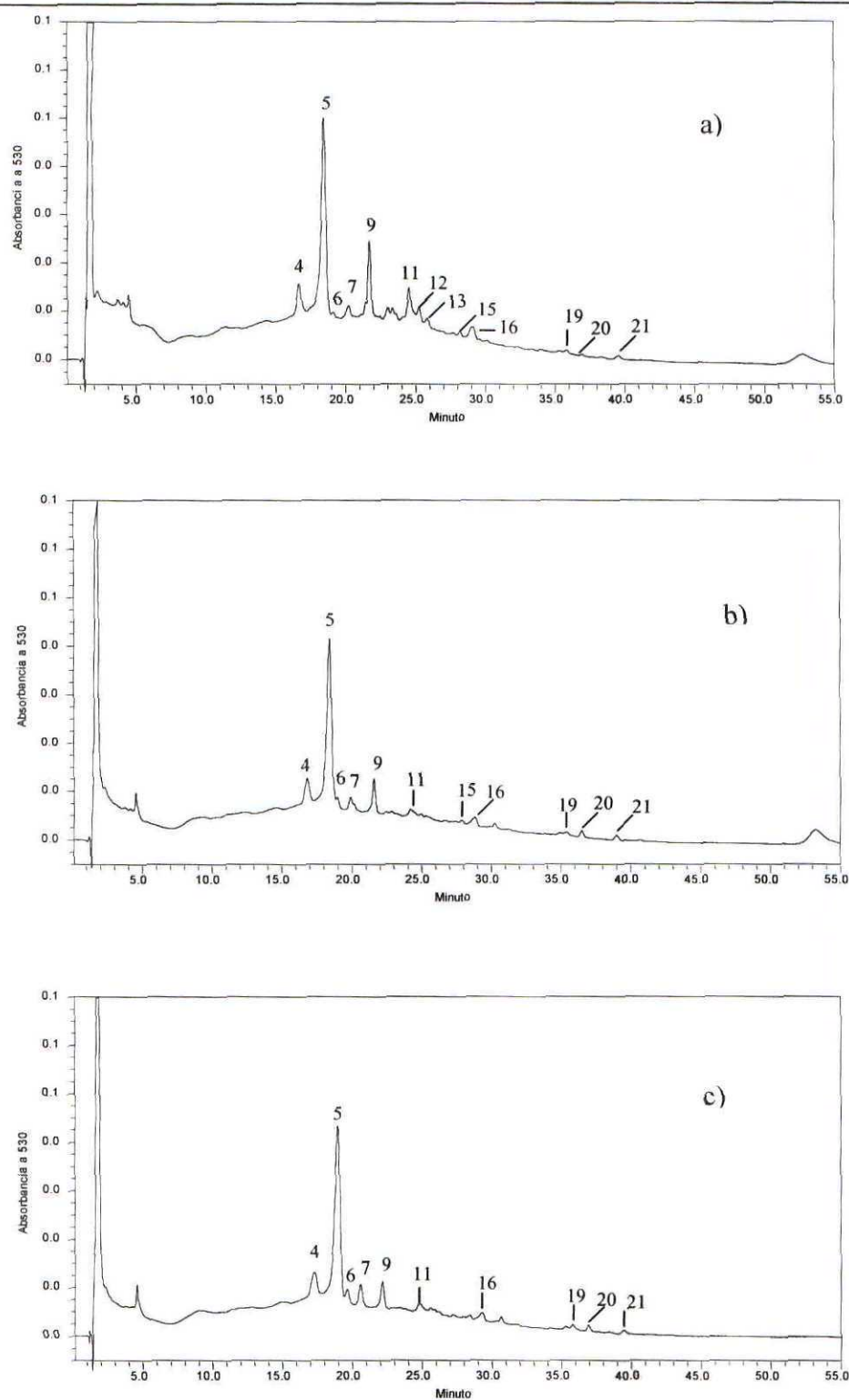


Figura 38. Cromatogramas correspondientes a los compuestos antociánicos analizados en los vinos elaborados con la variedad Monastrell a) Vino base; b) Vino espumoso de 9 meses; c) Vino espumoso de 18 meses.

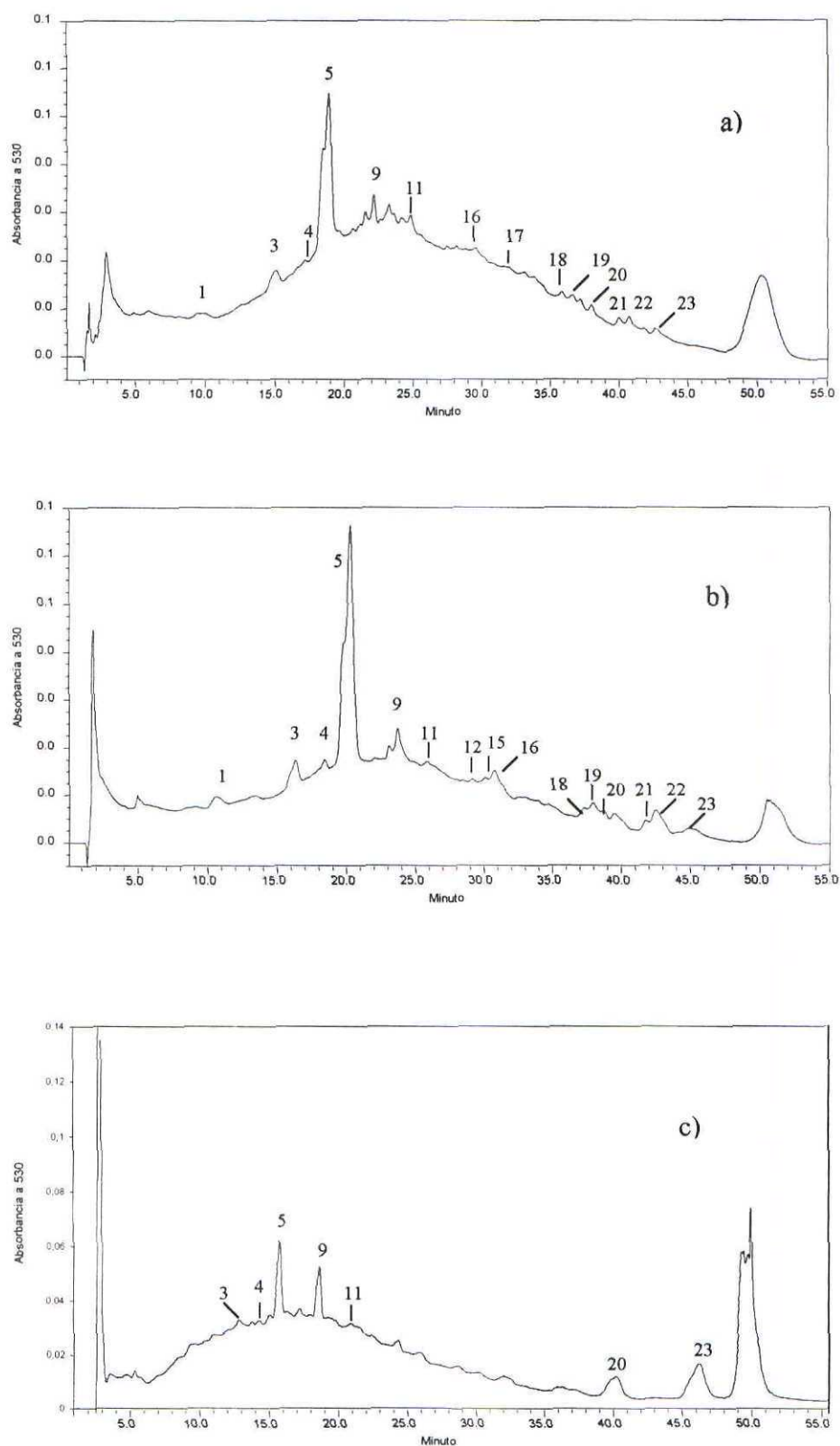


Figura 39. Cromatogramas correspondientes a los compuestos antociánicos analizados en los vinos elaborados con la variedad Garnacha. a) Vino base; b) Vino espumoso de 9 meses; c) Vino espumoso de 12 meses.

La vitisina A, también disminuye durante este periodo en los vinos elaborados con las variedades Trepát y Monastrell, siguiendo la tónica del resto de grupos anteriormente citados. Sin embargo, en los vinos espumosos elaborados con la variedad Garnacha experimenta un aumento durante este periodo. Revilla y col., (1999), indican que este compuesto aunque aparece en vinos jóvenes, es uno de los más abundantes en los vinos envejecidos. Como este comportamiento, es contrario al que ocurre con otros monómeros de antocianina, que después de varios meses disminuyen su concentración, determinan que en los vinos envejecidos la Vitisina A es mayoritaria, porque no experimenta variaciones durante este tiempo.

Los complejos antociano-procianidina, disminuyen durante este periodo, en los vinos elaborados con todas las variedades, esto podría deberse a que se trata de asociaciones poco estables químicamente, a hidrólisis enzimática, o por adsorción a las paredes de las levaduras.

Los vinos espumosos de 9 meses elaborados con la variedad Garnacha, presentan un comportamiento atípico comparado con los elaborados con las otras variedades. En estos vinos, durante los 9 primeros meses de envejecimiento, se va a producir un aumento en todos los grupos de antocianos, excepto el de glucósidos dehidroxilados, que ya presentan muy baja concentración en el vino base, y el grupo de complejos antocianos-procianidinas, en el que si se produce una gran disminución durante este periodo.

En el cromatograma correspondiente al vino base Garnacha (**Figura 39**), se puede observar, un pico ancho y bastante grande que eluye al final del cromatograma, y no ha sido cuantificado, con un tiempo de retención de aproximadamente 45 min, y que correspondería a antocianos complejos, formados por distintas uniones entre un antociano y otros flavonoles, y que tiene un máximo de absorbancia a más de 500 nm en la zona del rojo. A los 9 meses sin embargo, este pico ha disminuido, a pesar de que el resto de grupos antocianos han experimentado un aumento. Esto podría deberse a que durante este tiempo se ha producido una hidrólisis de este tipo de antocianos complejos, liberando otros mas sencillos que serían los responsables del aumento que se observa a los 9 meses. En los vinos procedentes de las otras variedades, el pico correspondiente a

estos antocianos complejos con absorbancia en el rojo es muy pequeño. Esto podría ser debido al tipo de elaboración de los vinos Trepát y Monastrell. Estos vinos han sido vinificados en blanco, y por tanto no se ha producido la maceración con los hollejos, con lo que se extraerían menos compuestos antocianos, y el pico que aparece al final de estos cromatogramas es ostensiblemente menor que el del vino base elaborado en rosado. La hidrólisis de este tipo de compuestos en los vinos base Garnacha, al estar en gran concentración supondría un notable aumento de los diferentes antocianos, que es lo que se observa durante este periodo.

Se puede comprobar en los cromatogramas de los diferentes vinos, que se sigue produciendo una disminución de todos los compuestos a partir de los 9 meses, aunque no de manera tan acusada como durante los 9 primeros meses de envejecimiento. En los vinos espumosos de la variedad Trepát (**Figura 37**) se produce una pequeña disminución en todos los grupos de antocianos entre los 12 y 18 meses, mucho menor que la experimentada entre el vino base y los vinos de 9 meses de envejecimiento. En los cromatogramas de 12 y 18 meses, se puede observar además de la disminución del área de los picos, la práctica desaparición de todos ellos a los 18 meses de envejecimiento, únicamente permanecen aún en el vino el peonidín y malvidín glucósido, (picos 4 y 5) así como la vitisina A (pico 9), que como ya se ha comentado anteriormente, parecen tener una gran resistencia al envejecimiento. Estos dos glucósidos siguen estando presentes aunque en baja proporción, debido a que los vinos de esta variedad poseen la mayor cantidad, por tanto aunque han disminuído bastante, siguen estando presentes. El malvidín-acetil-glucósido, malvidín-caferoil-glucósido, y el malvidín-cumaril-glucósido, (picos 16, 17, y 19) se han podido llegar a identificar, aunque se encuentran en cantidades traza en estos vinos, y por tanto no se han podido cuantificar.

En el vino Monastrell (figura 38), se puede comprobar como durante este periodo, se ha producido una disminución pero menos acusada que en el caso anterior, incluso los glucósidos cumarílicos aumentan ligeramente a partir de 9 meses, aunque debido a la muy baja proporción en la que se encuentran, estos aumentos son poco importantes. Se puede comprobar que a los 18 meses siguen apareciendo los glucósidos petunidín, peonidín y malvidín, (picos 3, 4, 5), la fisetinidina, (pico 7), la vitisina A

(pico 9), el malvidín-catequina, (pico11), y el peonidín y malvidín acetil glucósido (picos 15 y 16).

Los vinos de la variedad Garnacha (**Figura 39**), como se ha comentado en el apartado anterior, presentan un comportamiento distinto a los otros vinos durante los 9 primeros meses de envejecimiento, en el que experimentan aumentos en casi todos los grupos de antocianos. A los 12 meses, sin embargo, se ha producido una disminución en casi todos ellos. En el cromatograma correspondiente a este tiempo se puede comprobar que la escala de absorbancias (eje X), ha experimentado una notable disminución. Los picos correspondientes a los glucósidos, petunidín, peonidín, y malvidín (picos 3, 4, y 5), han disminuido mucho, la malvidín-catequina (pico11) sigue apareciendo, pero es importante resaltar que han desaparecido todos los glucósidos acetilados y cumarílicos, que sí estaban presentes en el vino de 9 meses. Los que no han experimentado cambios durante este periodo, e incluso presentan pequeños aumentos, como se muestra, son el derivado de malvidín-glucosa (pico 20), así como el derivado de alto peso molecular III (pico 23). A su vez, se puede comprobar que el pico que eluye al final del cromatograma, que parece corresponder a antocianos con alto peso molecular y con absorbancia en el rojo ha aumentado. Otro hecho que se produce es que entre el pico 11, correspondiente a la malvidín-catequina, y el pico 20 que es un derivado de malvidín-glucosa, aparecen otros muchos picos de pequeño tamaño, que no corresponden por sus características espectrales a ningún acetil o cumaril-glucósido, y que presentan en cambio características espectrales más parecidas a las que tendrían combinaciones entre antocianos y procianidinas, que se formarían a partir de 9 meses, ya que no están presentes en los vinos con este tiempo de envejecimiento.

Se podrían resumir los cambios producidos en los distintos grupos de antocianos analizados en vinos espumosos de más de 9 meses de envejecimiento con levaduras, en que en general se va a producir una disminución de todos estos compuestos durante este periodo, aunque de manera menos brusca que durante los 9 primeros meses. La disminución es mayor o menor, dependiendo de la variedad de uva de origen. En los vinos de Trepát, la pérdida es muy rápida y a los 18 meses prácticamente han desaparecido todos estos compuestos. En los Monastrell la desaparición es mucho más lenta, y a los 18 meses, conservan todavía muchos de los antocianos presentes en el vino

base. En los vinos de Garnacha, hay algunos grupos que siguen aumentando como el de antocianos-procyanidinas y antocianos complejos de alto peso molecular.

3.9 Determinación de los parámetros de color en los vinos base y espumosos elaborados con variedades tintas.

La medida de los compuestos fenólicos no da una idea exacta del color final del vino por lo que es necesario determinar esta cualidad mediante un método objetivo, fiable y preciso. Existen diversos métodos, propuestos para evaluar el color (cálculo de los valores triestimulares, método rápido de Sudraud, 1958, etc). Se ha empleado el método de Glories, que se basa en el cálculo de diferentes parámetros que son la intensidad, tonalidad, % de amarillo, % de rojo, y % de azul, obtenidos tras la medida directa en el vino de las absorbancias a tres longitudes de onda diferentes, 420, 520, y 620nm. El cálculo de estos parámetros se detalla en el apartado 2.6 de Materiales y Métodos.

En la **figura 40**, se representan en diagrama de barras los distintos parámetros que definen el color, en los distintos vinos base y vinos espumosos de 9 meses estudiados. Sólo se han incluido los vinos espumosos de 9 meses ya que como hemos visto en el apartado 3.8.2 es durante estos primeros 9 meses en los que se van a producir los mayores cambios en los compuestos antocianos, y son este grupo de compuestos los que van a influir en estos parámetros. Los valores de intensidad de color y tonalidad, están multiplicados por 100, para poder comparar más fácilmente todos los datos.

3.9.1 Intensidad colorante

La intensidad colorante, es mayor en el vino base de la variedad Monastrell. El vino base de la variedad Garnacha que es el único elaborado en rosado, tiene sin embargo, la menor intensidad. Esto es debido a que aunque la absorbancia a 520, es la mayor de todos los vinos estudiados, la absorbancia correspondiente a 420, es la más baja, y por tanto la suma da el valor más bajo. A los 9 meses se produce una disminución en este parámetro en todos los vinos, mayor en el vino de la variedad Monastrell. También esta disminución es muy importante en el vino de la variedad

Garnacha a pesar de que durante este periodo, como se ha visto en el apartado 3.8.2, están aumentando casi todos los grupos de antocianos, por tanto los antocianos no serían los únicos responsables de la intensidad de color en los vinos.

3.9.2 Tonalidad

La tonalidad, da idea del matiz de color del vino. Valores altos expresan un cambio hacia el amarillo, es decir hacia tonos anaranjados, tejas, marrones, con un aumento de la absorbancia en la región de los 400 nm. Valores bajos de este parámetro indican ausencia de estos tonos, y por tanto, características de vino joven.

En general los valores obtenidos para este parámetro en los vinos estudiados son mucho mas altos de los que corresponderían a un vino joven, teniendo en cuenta que en estos vinos el valor de tonalidad está en torno a 0,5 (50, al multiplicarlo por 100). Todos los vinos estudiados sobrepasan bastante este valor. El valor más elevado lo presenta el vino base de la variedad Trepát, con 131, mientras que el Garnacha, presenta un valor bastante parecido, 125. El vino Monastrell es el que tiene el menor valor, 93,5. Estos valores indican que todos estos vinos presentan una importante componente de tonos anaranjados. A los 9 meses se produce un aumento de este parámetro en los vinos espumosos de las variedades Monastrell y Trepát. Este aumento es mucho mayor en este último caso, en el que se alcanza un valor de 208, mientras que es menor en el espumoso de la variedad Monastrell, que lo hace hasta 132. El vino espumoso Garnacha tiene un comportamiento distinto, y se produce un aumento en este parámetro durante estos primeros 9 meses. Esto estaría de acuerdo con lo comentado en la sección (xx), en la que se comprobó que los antocianos disminuían desde el vino base a los 9 meses en los vinos Trepát, y Monastrell, y las disminuciones eran más importantes en este último caso, mientras que en los vinos Garnacha se produce un aumento que repercute en una mayor tonalidad. Por tanto, la evolución de este parámetro es similar a lo que ocurre con los antocianos del vino, mientras que la intensidad colorante no sigue este comportamiento.

3.9.3 Porcentaje de rojo

El porcentaje de rojo, indica la contribución de la componente roja al color final del vino, y da una idea de si el vino es o no joven. Un alto porcentaje de rojo es indicativo de vinos jóvenes, mientras que esta componente va disminuyendo según envejece el vino. El porcentaje de rojo para los vinos base Trepát y Garnacha es bastante similar aproximadamente 41, y para Monastrell, un poco más elevado, 48. A los 9 meses, mientras que en los vinos Trepát y Monastrell hay una disminución de alrededor de 10 unidades, en el vino Garnacha se produce un pequeño aumento de este parámetro. Esto último de nuevo coincide con el aumento de antocianos encontrado a los 9 meses en esta variedad, como ya se comentó en la sección anterior

3.9.4 Porcentaje de amarillo

El porcentaje de amarillo evalúa la contribución de la absorbancia en la región de los 400 nm al color total del vino, al igual que la tonalidad. Estos dos parámetros se hallan por tanto altamente correlacionados (Gómez-Cordovés y González-Sanjosé, 1995). Se puede comprobar que el porcentaje de amarillo es bastante similar en los vinos base de Trepát y Garnacha, y algo menor en los Monastrell. Durante los primeros 9 meses, se produce una evolución similar a la comentada para la tonalidad, un aumento en los vinos espumosos de Trepát y Monastrell, y una disminución en los vinos Garnacha, que obviamente es lo contrario de lo que ocurría con el porcentaje de rojo.

3.9.5 Porcentaje de azul

En cuanto al porcentaje de azul, los valores son mucho más bajos que para las otras componentes. Esta contribución es menor en los vinos base de la variedad Trepát que en los Monastrell y Garnacha, que son similares entre ellos. A los 9 meses presentan comportamientos distintos, así el vino espumoso de la variedad Trepát experimenta un aumento, mientras que en los de las variedades Garnacha y Monastrell se produce una disminución. Este comportamiento es semejante al que se produce en la componente amarilla y contrario al que experimenta la componente roja. Por tanto el aumento de la componente roja, se produce a costa de una disminución en las componentes amarilla y azul. El aumento que se produce a los 9 meses en los vinos

espumosos de la variedad Garnacha coincide con el aumento de todos los grupos antocianos, excepto con los glucósidos dehidroxilados y los antocianos complejos de alto peso molecular, que por tanto podrían contribuir principalmente a la componente azul.

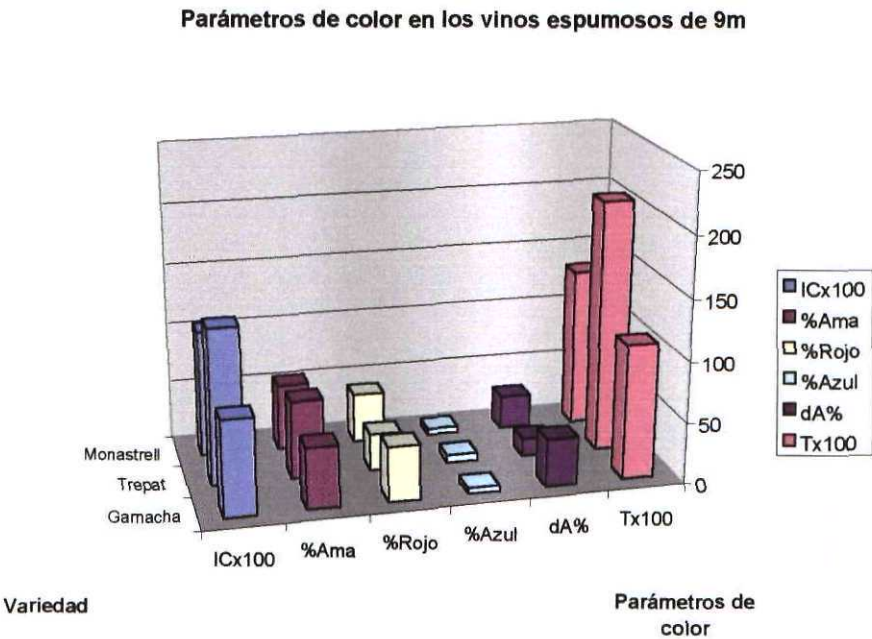
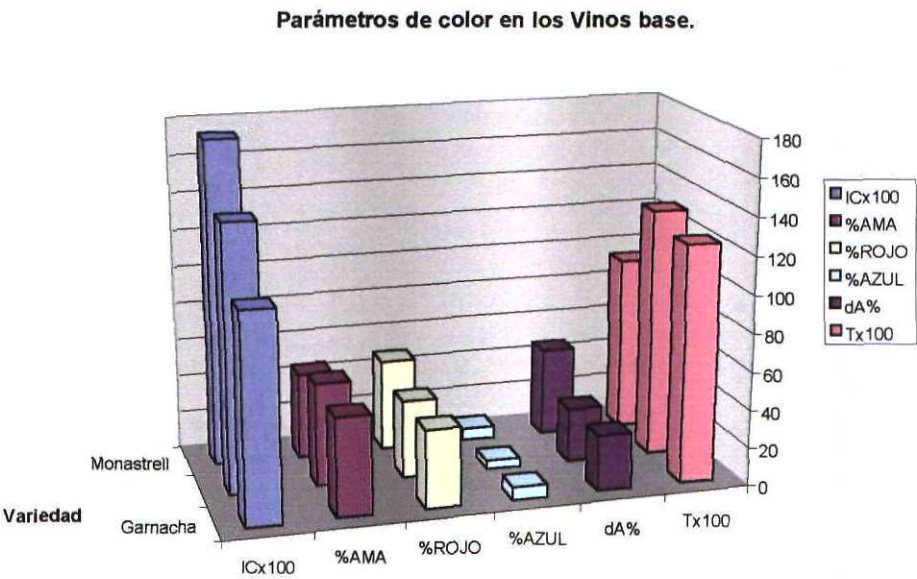


Figura 40. Parámetros de color en los vinos base y en los espumosos de 9 meses elaborados con las variedades Trepát, Monastrell y Garnacha.

Se podrían resumir los cambios que se producen durante los primeros 9 meses de envejecimiento, en una disminución de la intensidad colorante en todos los vinos espumosos, independientemente de la variedad de uva empleada en su elaboración. El comportamiento que presentan los demás parámetros es distinto sin embargo dependiendo de la variedad de uva. Los vinos de las variedades Trepát y Monastrell, presentan un comportamiento bastante similar, y experimentan una disminución en el porcentaje de rojo, que se traduce en aumento de la tonalidad y de los porcentajes de amarillo y azul. En los vinos de la variedad Garnacha el comportamiento es al contrario, un aumento del porcentaje de rojo, y una disminución de la tonalidad y de los porcentajes de amarillo y azul.

3.10 Análisis de las características espumantes de vinos base y vinos espumosos

En el siguiente apartado se van a estudiar las características espumantes en diferentes vinos base y vinos espumosos. Se comprobará la influencia de las variables cepa de levadura empleada durante la segunda fermentación, adición de bentonita en el licor de tiraje, empleo de variedades tintas vinificadas en blanco, y en rosado, así como la influencia de las condiciones de cultivo de la variedad Parellada. Además se evaluará la idoneidad del empleo de mezclas de vinos base elaborados con variedades tintas y blancas en las características espumantes de los vinos espumosos.

3.10.1 Análisis de las características espumantes de los vinos elaborados con diferentes cepas de levadura, y con adición o no de bentonita en el licor de tiraje.

Para el estudio de las características espumantes de los vinos durante la segunda fermentación y el envejecimiento en botella se utilizó el equipo que se describe en el apartado 2.7.1 diseñado en el Instituto de Fermentaciones Industriales. Los valores que se han medido son la altura a la que la espuma se estabiliza (Hm) y la desviación estándar de la altura de la espuma ($sd300$). No se dan los valores de la altura del pico de espuma en los vinos ($Hpico$), ya que en algunas muestras no se pudo determinar correctamente por saturarse el detector por la presencia de CO_2 . En un trabajo previo en el que se utilizó este método para la medida de la calidad espumante de los vinos (Moreno-Arribas y col., 2000) se encontró que $Hpico$ y Hm se relacionaban linealmente, lo que no hace imprescindible su medida.

En la **tabla 44**, se muestran los valores de Hm y $sd300$, determinados por Martínez-Rodríguez, (2000), y obtenidos de tres medidas en cada uno de los vinos elaborados con las diferentes cepas de levadura, y con adición o no de bentonita en el licor de tiraje.

Tabla 44. Valores de $H_{\text{plató}}$ y sd , en el vino base, y en los vinos espumosos de distinto tiempo de envejecimiento elaborados con las diferentes cepas de levaduras, y con adición o no de bentonita en el licor de tiraje.

Cepa	Tiempo (días)	H plató (mV)		Sd	
		c	s	c	s
	Vino Base		480,3		17,8
EC1118	20	390,8	563,4	17,6	23,7
	40	299,8	484	2,4	15,2
	90	360,4	376,7	4,7	6,1
	180	312,9	538,9	2,9	19
	270	278,7	482,7	2,3	19,6
	365	341	501,5	2,9	13,1
IFI-473	20	473,2	500,3	28,3	25,5
	40	323,8	438,4	2,8	11,1
	90	353,7	427,2	3,7	12,3
	180	459,4	496,2	14,1	18,6
	270	303,5	503,2	1,3	23,8
	365	292,2	538,7	1,4	14,7
IFI-475	20	420,9	493,3	5,8	29,1
	40	393,4	430,3	19,9	5,5
	90	318,2	496,4	2,6	14,7
	180	481,1	526,3	15,1	19,3
	270	306,9	469,4	2	23,1
	365	318	509,2	2,6	15
P-29	20	452,2	491,2	35,7	27,6
	40	353	409	4,5	13,2
	90	343,2	513,1	3	24,5
	180	431,2	530,8	15,2	21
	270	330,8	480,7	2,2	21,7
	365	352,8	489	8,4	13
J	20	492,2	495,9	33,8	30,1
	40	330,1	371,7	10,5	13,2
	90	352,2	401,5	4,3	8
	180	330,7	516,7	3,1	19,7
	270	345,7	455,7	5,7	15,9
	365	334,8	516,7	8,5	14,1

* c = con adición de bentonita, s = sin adición de bentonita.

Para comprobar qué factores de los estudiados, cepa de levadura, adición de bentonita, y tiempo de envejecimiento, influían más en las características espumantes de los vinos (*Hm* y *sd300*), se llevó a cabo un análisis de varianza de dos factores con los valores correspondientes al *Hm* y *sd300*, mezclando las interacciones y el término del error. El resultado de este análisis (datos no mostrados), concluyó que el empleo de bentonita y el tiempo de envejecimiento influían significativamente en las características espumantes de los vinos, mientras que el empleo de diferentes cepas de levadura no afecta a las características espumantes.

En la **figura 41**, se representan en diagrama de barras los valores correspondientes a la *Hm*, y la *sd300*, junto con la desviación típica en cada periodo de tiempo, para los vinos sin y con bentonita (a y b, respectivamente), una vez comprobado que la cepa de levadura no influye en estos parámetros. Los valores de *sd*, se han multiplicado por 10, para facilitar la visión de los datos utilizando la misma escala. Se puede comprobar que los vinos elaborados sin adición de bentonita presentan características espumantes superiores a los vinos elaborados con adición de bentonita. En los vinos elaborados sin bentonita, en los primeros 20 días de la fermentación, se produce un pequeño aumento de la *Hm*, mientras que en los elaborados con bentonita se produce una disminución. Durante el envejecimiento, entre los 40 y 90 días continúa disminuyendo, en ambos tipos de vinos. A los 180 se obtienen los valores más altos, y a partir de aquí, se produce una nueva disminución a los 270 y 365 días de envejecimiento.

Salvo alguna excepción, al igual que la *Hm*, como se puede comprobar en la **figura 41**, la *sd300* de la espuma es mayor en los vinos elaborados sin bentonita que en los vinos correspondientes elaborados con bentonita. La *sd300*, indica el tipo de espuma que presenta el vino, así altos valores de este parámetro, se corresponden con una espuma con grandes fluctuaciones y más vigorosa. La tendencia de evolución con el tiempo es análoga en ambos grupos de vinos. Los valores de *sd300* son mayores a los 20 días después del tiraje, disminuyen a los 40 días y aumentan posteriormente.

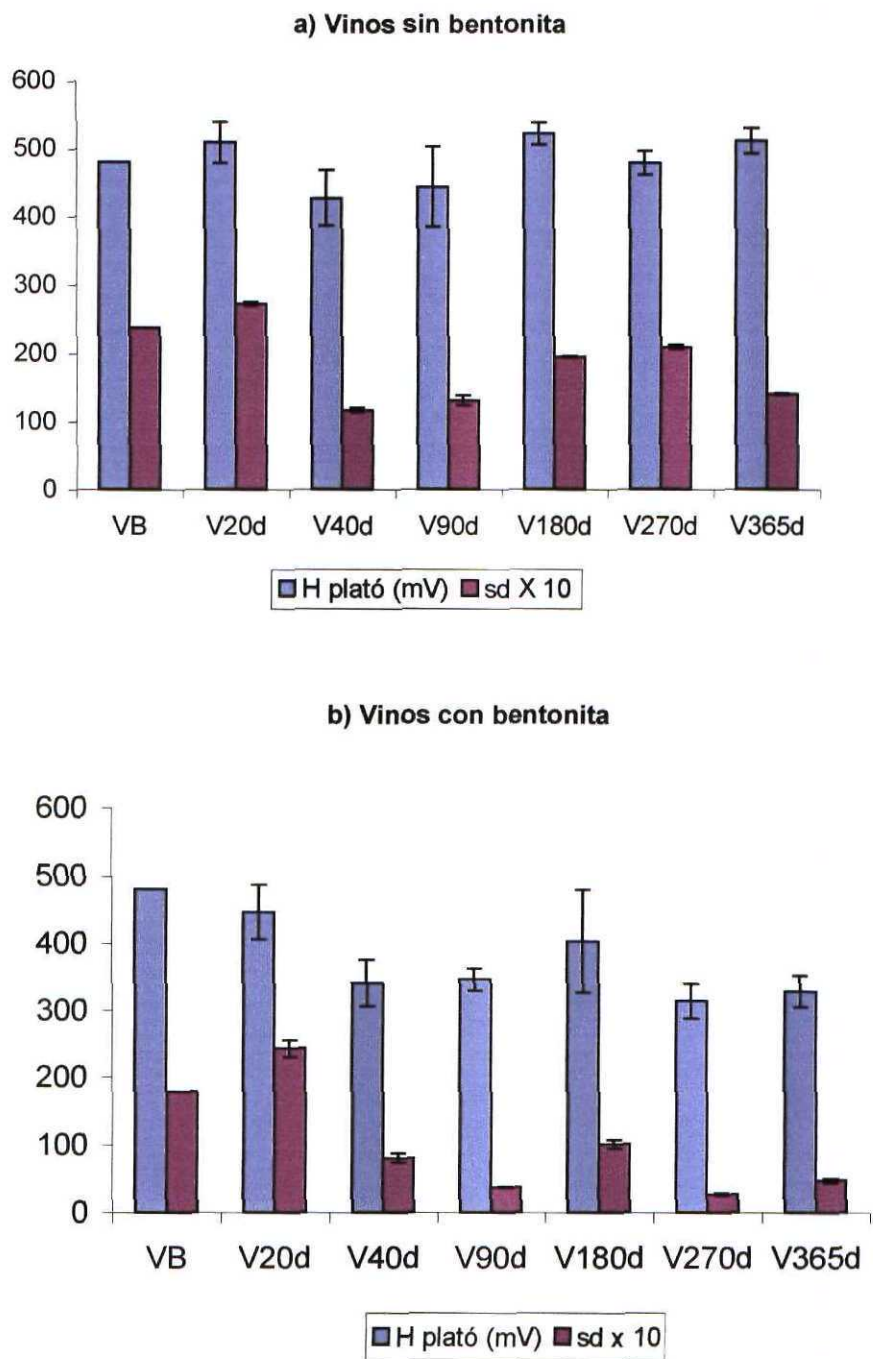


Figura 41 Valores medios y (\pm) desviación estándar de la H plató (mV), y sd, en los vinos a) con bentonita, y b) sin bentonita, en los diferentes tiempos de envejecimiento.

Resumiendo los resultados del análisis de las características espumantes, se puede concluir que el empleo de bentonita en la solución de tiraje, a pesar de la baja concentración que se añade, afecta a las propiedades espumantes de los vinos. Algunos autores han señalado que la bentonita puede afectar a la permanencia de la espuma en vinos de Champagne (Senée y col., 1998). El tiempo de envejecimiento del vino con las levaduras también va a afectar a las características espumantes de los vinos. Después de 180 días de envejecimiento en presencia de las levaduras, la *Hm* de espuma aumenta, lo que coincide con la detección en el vino de los productos de la autólisis de las levaduras. Diferentes autores (Maujean y col., 1990; Pueyo y col., 1995; Andrés-Lacueva y col., 1997) han señalado que el envejecimiento de los vinos con las levaduras contribuye a mejorar la calidad de la espuma.

No se observan variaciones importantes entre la calidad de la espuma de los vinos elaborados con cepas diferentes de levadura.

3.10.2 Estudio de las características espumantes de los vinos elaborados con las variedades de uvas tintas Trepát, Monastrell y Garnacha. Cambios durante la segunda fermentación y el envejecimiento con las levaduras desde 9 a 18 meses.

Para el estudio de las características espumantes de los vinos base y de los vinos espumosos durante la segunda fermentación y el envejecimiento con las levaduras, se utilizó el mismo equipo del apartado anterior. Los parámetros que se han medido son la altura máxima de pico (*H pico*), la altura a la que la espuma se estabiliza (*Hm*), y la desviación estándar de la altura de la espuma (*sd 300*), parámetros que se han descrito también en el apartado 2.7.1

En la **tabla 45**, se muestran los valores correspondientes a los tres parámetros estudiados en los vinos base, y en los vinos de 9 y 18 meses de envejecimiento, en el caso de los vinos

Trepat y Monastrell, y a los 9 y 12 meses de envejecimiento, en los vinos elaborados con la variedad Garnacha. Los valores, son los correspondientes a la medida de tres gasificaciones por muestra.

Como se puede comprobar en la **tabla 45**, los vinos base Trepat tienen una gran dispersión en el parámetro *Hpico*, que disminuye sin embargo en los vinos espumosos. Los vinos base y espumosos Garnacha tienen mayores valores de *Hpico* que los otros dos vinos. La *Hm* es mayor también en los vinos Garnacha, excepto en el vino base, en el que este parámetro es mayor en los vinos base elaborados con Trepat. Los vinos Garnacha, de nuevo, son los que tienen valores más altos del parámetro *sd300*. Los menores valores de *sd300*, los tienen los vinos espumosos Trepat, seguidos de los vinos base y espumosos Monastrell. Los vinos base Trepat presentan mayores valores de *sd300*, que los vinos espumosos respectivos.

Tabla 45 Valores de H_{pico} , H_m y sd , en los vinos base, y en los vinos espumosos de distinto tiempo de envejecimiento elaborados con diferentes variedades de uvas tintas.

Vinos	Tiempo (meses)	H pico (mV)	H m (mV)	sd 300
Trepát 1	V base	820,5 ± 234,9	481,57 ± 17,71	15,90 ± 2,57
	9 m	269,37 ± 8,34	234,20 ± 1,60	1,87 ± 0,38
	18 m	322,53 ± 60,44	247,80 ± 6,97	2,10 ± 0,30
Trepát 2	V base	779,0 ± 62,23	485,43 ± 61,03	19,63 ± 4,03
	9 m	302,20 ± 17,06	262,70 ± 5,84	1,77 ± 0,38
	18 m	313,60 ± 44,82	262,20 ± 1,93	2,17 ± 0,12
Monastrell 1	V base	247,03 ± 12,66	202,43 ± 8,02	7,53 ± 0,25
	9 m	261,50 ± 22,52	229,00 ± 10,78	5,50 ± 1,30
	18 m	263,47 ± 42,20	176,30 ± 5,88	3,10 ± 0,46
Monastrell 2	V base	195,90 ± 19,75	141,03 ± 7,25	8,2 ± 4,25
	9 m	237,40 ± 21,75	158,10 ± 1,10	2,73 ± 0,21
	18 m	242,13 ± 24,76	196,10 ± 19,69	3,10 ± 0,46
Garnacha	V base	1267,5*	393,67 ± 37,07	21 ± 6,5
	9 m	955,00*	413,9 ± 25,91	23,30 ± 2,95
	12 m	649,8 ± 214,9	433,40 ± 25,9	28,50 ± 4,33

*Una sola gasificación.

En la **figura 42**, se muestra la evolución de estos tres parámetros en los vinos elaborados con las variedades Trepát y Monastrell durante la segunda fermentación y el envejecimiento.

Como puede observarse en la **figura 42a**, la evolución de *Hpico* es diferente en los vinos Trepát que en los Monastrell. Los vinos base Trepát, tienen valores de este parámetro mayores que los Monastrell. Durante la segunda fermentación y 9 meses de envejecimiento, se produce una brusca disminución de este parámetro en los vinos elaborados con la variedad Trepát, mientras que en este periodo de tiempo los valores iniciales de este parámetro, prácticamente no varían en los vinos Monastrell. Esto hace que a los 9 meses, los valores de *Hpico* sean muy parecidos en los vinos elaborados con una u otra variedad. A los 18 meses apenas se producen variaciones en la *Hpico* en ninguno de los vinos, manteniendo valores similares a los de 9 meses.

En la **figura 42b**, se representa la evolución del parámetro *Hm*. De nuevo, el comportamiento de los vinos elaborados con las dos variedades es diferente y muy similar al comentado anteriormente para la *Hpico*, lo que estaría de acuerdo con Moreno-Arribas y col., (2000) que como ya se ha comentado, encontró una relación lineal entre estos dos parámetros. Los vinos base Trepát tienen valores de *Hm* mayores que los Monastrell. Durante la segunda fermentación y el envejecimiento, se produce una disminución muy acusada en los primeros, mientras que en los Monastrell prácticamente no varían. A los 18 meses, como ya ocurriera con la *Hpico*, no se observan variaciones significativas en este parámetro.

La evolución del parámetro *sd300*, puede observarse en la **figura 42c**. De nuevo, los valores más altos de este parámetro los presentan los vinos base Trepát, aunque las diferencias con los Monastrell son menos acusadas que en los anteriores parámetros. Durante la segunda fermentación y el envejecimiento, se produce una muy brusca disminución de la *sd300* en los vinos Trepát. También se produce una disminución en los Monastrell, pero menos acusada. A los 9 meses, todos los vinos tienen valores similares, o

algo mayores en los Monastrell, esta pequeña diferencia se atenúa a los 18 meses, ya que todos los vinos tienen entonces valores similares entre si, y prácticamente iguales que los de 9 meses.

En la **figura 43**, se representa la evolución de los parámetros *Hpico*, *Hm* y *sd 300*, desde el vino base hasta el vino espumoso de 12 meses elaborado con la variedad Garnacha. La *Hpico*, disminuye durante todo este tiempo de manera progresiva. Este mismo comportamiento lo tienen los vinos elaborados con la variedad Trepát, en los que esta disminución se produce hasta los 9 meses de envejecimiento. Sin embargo, la *Hm* permanece prácticamente constante en estos vinos durante la segunda fermentación y el envejecimiento, mientras que en las muestras elaboradas con Trepát, presentaba un comportamiento similar al de *H pico*. El parámetro *sd 300* también se comporta de manera distinta al de los otros vinos, y experimenta un ligero aumento durante este periodo de tiempo.

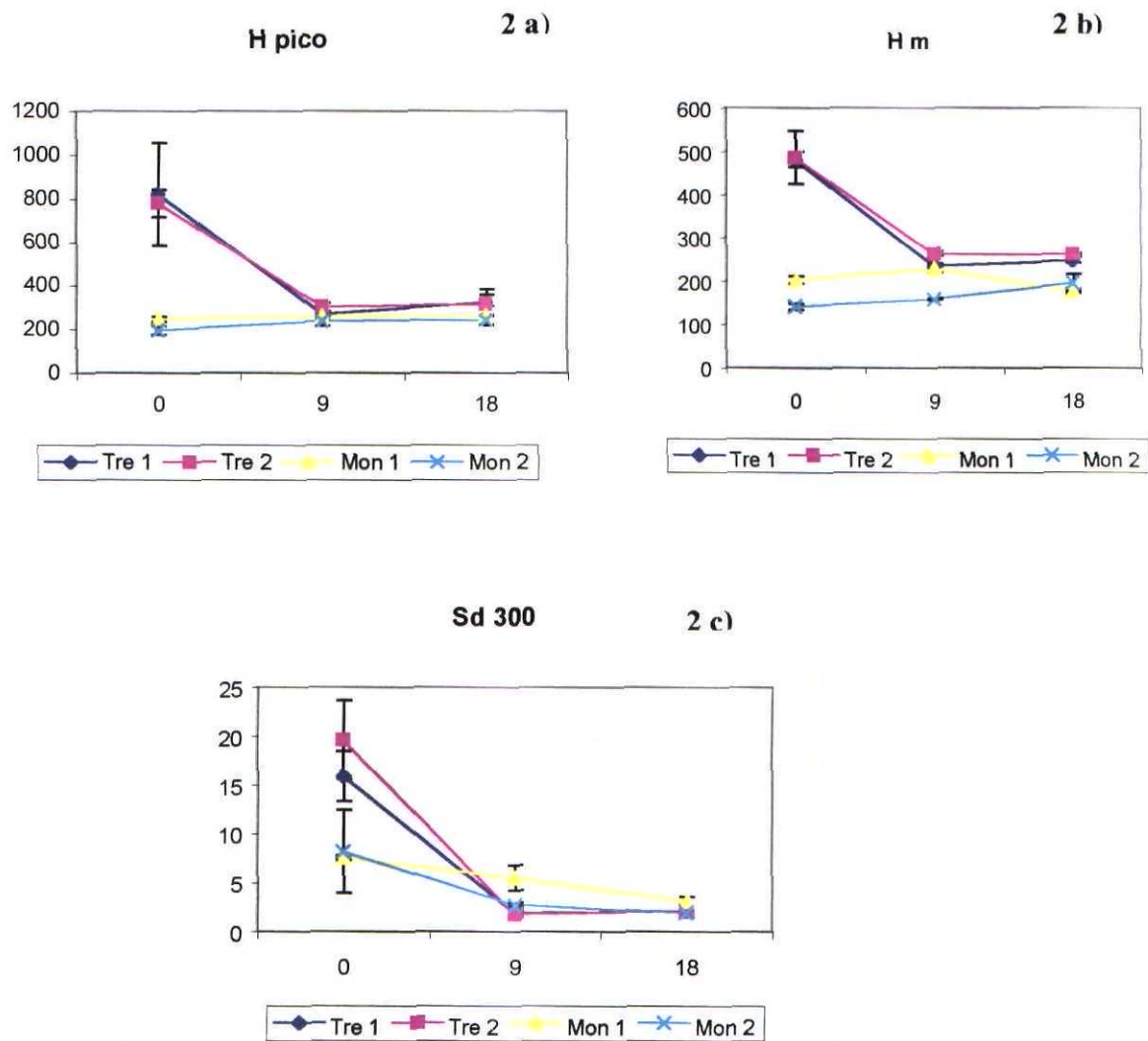


Figura 42. Evolución de los parámetros H pico, H m y sd 300, durante la segunda fermentación y el envejecimiento en los vinos elaborados con las variedades Trepát y Monastrell.

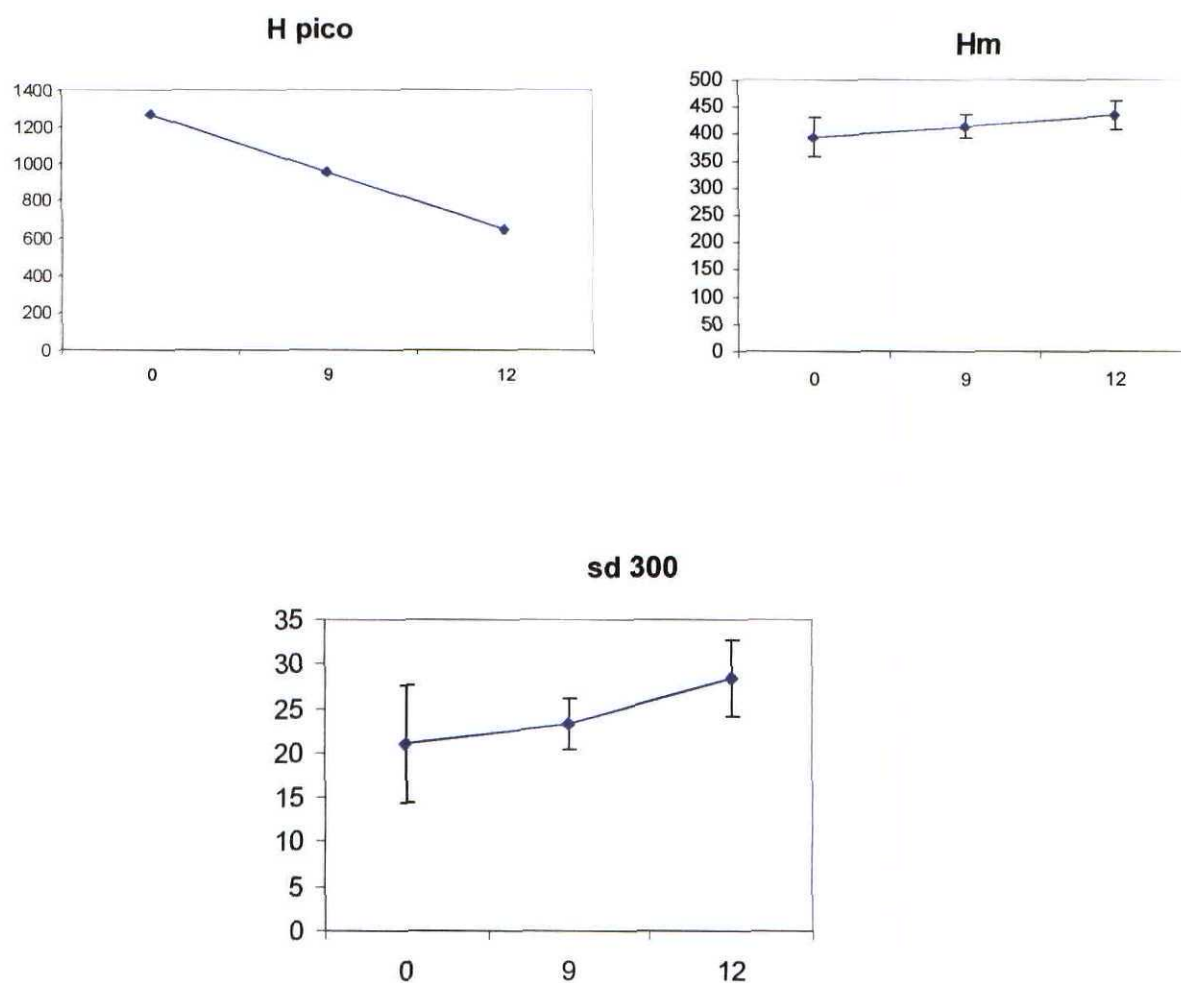


Figura 43. Evolución de los parámetros H pico, H m y sd 300, en los vinos elaborados con la variedad Garnacha.

Algunos autores, han encontrado una relación entre las propiedades espumantes de los vinos, y el contenido de algunos compuestos como las proteínas y péptidos (Maujean y col, 1990; Malvy y col, 1990; Pueyo y col., 1994, Andrés-Lacueva y col, 1996). Este tipo de compuestos estabilizan la espuma, bien porque se adsorben al CO_2 , o bien, porque se forman agregados micelares que pueden encapsular CO_2 en su interior (Pueyo y col., 1996). La suma de los valores de nitrógeno proteico y peptídico, que por tanto es una medida indirecta de la cantidad de proteína presentes en los vinos, se ha comentado en el apartado 3.5.3. Como se ha comprobado, el vino base y los vinos espumosos elaborados con la variedad Garnacha, tienen mayor concentración de nitrógeno proteico y péptidico que los vinos elaborados con las otras dos variedades. Los valores más bajos corresponden a los vinos Monastrell, que son los que a su vez tienen, especialmente los vinos base, menores valores tanto de *H pico* como de *H m*. La disminución observada en estos parámetros durante los 9 primeros meses de envejecimiento, coincide también con una disminución del valor correspondiente al nitrógeno proteico y peptídico en los vinos Trepát. Sin embargo, esta disminución es mucho menos acusada en los vinos Monastrell, en los que además no se producen variaciones importantes en los parámetros *Hpico* y *Hm*. En los vinos Garnacha, se observa durante los primeros 9 meses una disminución de *H pico*, que coincide con una disminución en la concentración del nitrógeno proteico y peptídico respecto al vino base. Sin embargo, no se observan variaciones significativas en el parámetro *Hm* durante este periodo. Algunos autores han señalado que debido a la baja concentración de proteínas en los vinos, es posible que su importancia resida más en las características de las proteínas, que en su concentración (Pueyo y col, 1996). A partir de los 9 meses y hasta los 18, no se observan cambios significativos en la concentración de los parámetros espumantes de estos vinos, pese a que en los vinos elaborados con Trepát y Monastrell, se ha comprobado un aumento en la concentración del nitrógeno proteico y peptídico a los 15 meses de envejecimiento, que sugiere el inicio de la autólisis. En los vinos Garnacha, en los que no se ha comprobado un aumento de compuestos nitrogenados durante los 12 meses que el vino ha envejecido con las levaduras, la *Hpico* sigue disminuyendo, pero la *Hm* se mantiene constante.

Del análisis de las características espumante se podría concluir, que los vinos base Trepát y Garnacha se asemejan bastante, y tienen los mayores valores de $H\text{ pico}$, Hm y $sd\ 300$. Los vinos espumosos, tienen en cambio un comportamiento diferente. Los vinos espumosos Garnacha de 9 meses tienen valores más bajos de $H\text{ pico}$ que los vinos base, y prácticamente similares de Hm , mientras que los vinos Trepát a los 9 meses tienen valores mucho más bajos de $H\text{ pico}$, y menores a su vez que los vinos espumosos Garnacha. Los valores de Hm siguen siendo menores que los vinos base y que los determinados en los vinos espumosos Garnacha. El parámetro $sd\ 300$, es más alto en los vinos espumosos Garnacha que en los Trepát. Los vinos espumosos de 18 meses no mejoran sus características espumantes respecto a los de 9 meses. Los vinos Monastrell, mantienen en general invariables estos parámetros durante el envejecimiento. A los 18 meses prácticamente no existen diferencias entre los vinos Monastrell y Trepát.

La influencia que los parámetros estudiados tendrán en la calidad final de la espuma que se formará en la copa, se podría resumir en que los vinos espumosos de 9 meses elaborados con la variedad Garnacha, con los valores más altos de $H\text{ pico}$ y Hm , alcanzarán mayor altura de espuma, formando una corona completa, ya que el parámetro Hm está muy relacionado con la cantidad de espuma. Sin embargo, debido a que tienen unos valores de $sd\ 300$ muy altos, esta espuma será muy dinámica, en continua evolución, con frecuentes oscilaciones, y por tanto, con mayor desprendimiento de CO_2 , con lo que la estabilidad de la espuma será menor. Los vinos espumosos Trepát, tienen menor cantidad de espuma, aunque la estabilidad de esta espuma será mayor, ya que se produce menor pérdida de CO_2 . Los vinos espumosos Monastrell se diferencian muy poco de los Trepát en cuanto a la calidad de espuma.

3.10.3 Estudio de las características espumantes de los vinos espumosos elaborados con la variedad Parellada. Influencia de las condiciones de cultivo.

Empleando el equipo Mosalux ®, se han determinado tres parámetros representativos de la calidad espumante de los vinos estudiados. Estos tres parámetros son la Hm , o altura máxima de la espuma, la Hs , que es la altura a la que se estabiliza, y Ts , o

tiempo que tarda en estabilizarse. La correlación positiva entre la altura máxima de la espuma y la altura a la que la espuma se estabiliza, ha sido puesta de manifiesto por Andrés-Lacueva y col. (1996), por tanto, en la **tabla 46**, se muestran únicamente los valores medios y la desviación típica, de H_s y T_s , expresados en mm, y en segundos, respectivamente, obtenidos del análisis de los vinos espumosos Parellada A (PA), y Parellada B (PB), a los 9, 12, 15 y 18 meses de envejecimiento con las levaduras.

Al realizar el análisis de varianza (datos no mostrados), de dos factores (tiempo de envejecimiento y condiciones de cultivo), con los datos de H_s y T_s , se demostró que tanto el tiempo de envejecimiento del vino con las levaduras, como la práctica vitícola empleada en los viñedos Parellada, influye significativamente en las características espumantes de los vinos así obtenidos. La influencia del tiempo de envejecimiento en las características espumantes de vinos espumosos de menos de 365 días, y medidas con el equipo de guía de ondas y ultrasonidos, se puso de manifiesto también en el apartado anterior.

En la figura **44a y 44b**, se muestra la evolución en el tiempo de los parámetros H_s y T_s , respectivamente, en los vinos espumosos Parellada A y Parellada B. Como puede observarse en la **figura 44a**, los vinos espumosos PA, en general, presentan valores más altos de H_s que los PB. En los dos tipos de vinos se produce un aumento de este parámetro a los 12 meses, aunque esta subida es mucho mayor en los PA. A partir de este tiempo los dos vinos experimentan una disminución de H_s , mucho más acusada de nuevo, en los PA, siendo más progresiva y menos brusca en los PB. A los 18 meses, los dos tipos de vinos alcanzan valores similares, que corresponden con los más bajos determinados.

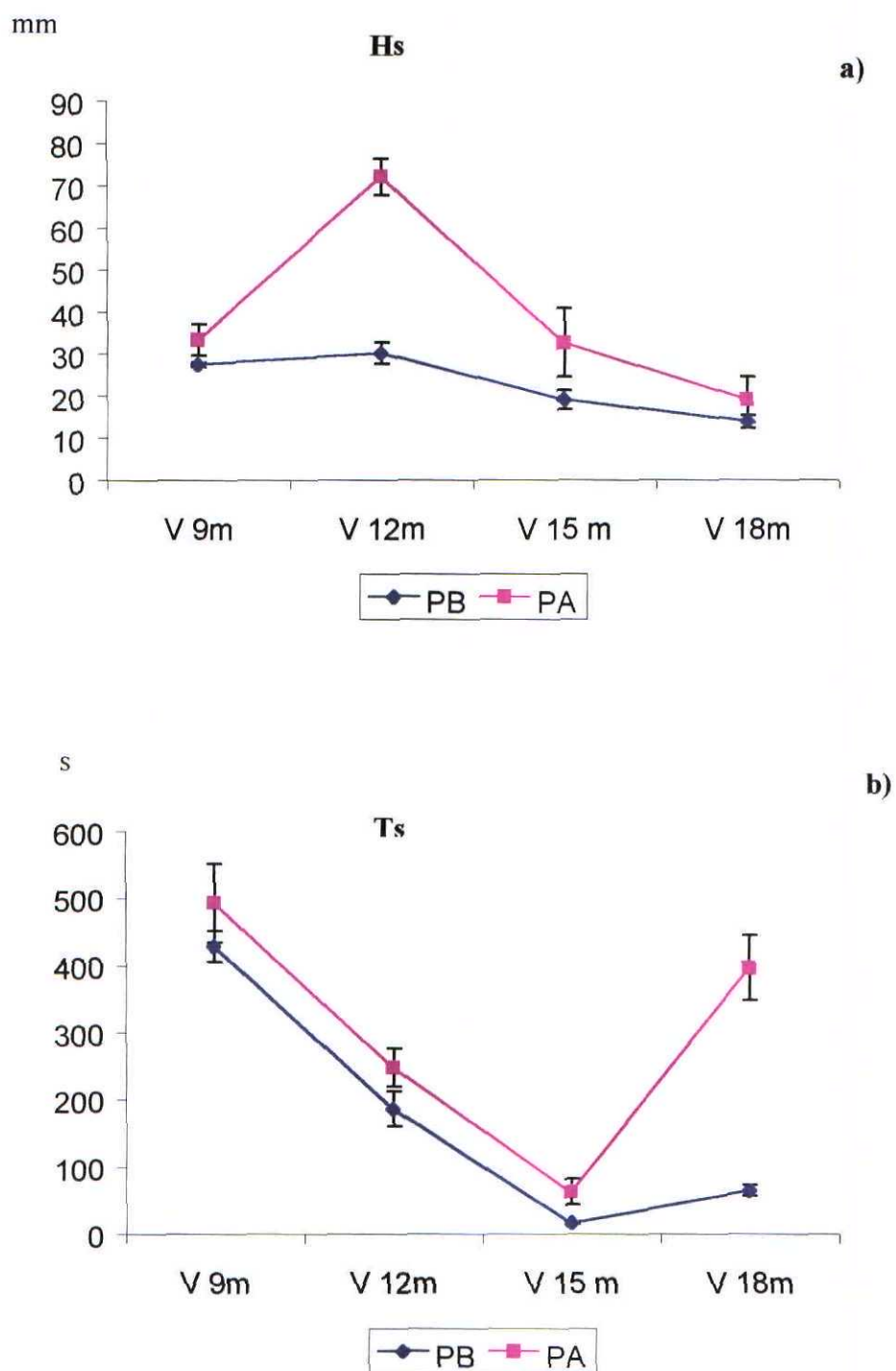


Figura 44. Evolución durante el tiempo de envejecimiento de los parámetros Hs (a) y Ts (b), en los vinos espumosos Parellada A y Parellada B.

La **figura 44b**, representa, la evolución del parámetro T_s , en los dos tipos de vinos PA y PB. Como puede observarse los valores son similares en ambos casos hasta los 15 meses. Durante todo este tiempo se está produciendo una disminución paulatina de este parámetro. A partir de este tiempo, tiene lugar un aumento del T_s , mucho más brusco en los vinos PA, que en los PB. En los vinos espumosos PA, a los 18 meses se alcanzan valores muy próximos a los que presentan los vinos de 9 meses.

En general se puede decir que los vinos espumosos elaborados a partir de viñedos sometidos a condiciones de cultivo de sobreexplotación (PA), presentan características espumantes diferentes a los vinos espumosos elaborados a partir de viñedos Parelladas cultivados según las prácticas culturales tradicionales (PB). Los vinos PA tienen valores de H_s , es decir la altura a la que se estabiliza la espuma mayores que los PB, siendo a los 12 meses el periodo de tiempo en el que se alcanzan mayores alturas, sin embargo, a los 15 meses las diferencias con PB se atenúan bastante. Los valores más altos de H_s encontrados en los vinos espumosos PA pueden tener relación con la mayor concentración de proteínas determinada en estos vinos. Distintos autores han descrito la influencia de las proteínas en las características espumantes de los vinos (Malvy y col, 1994; Pueyo y col., 1995). Andrés-Lacueva y col. (1996) determina una correlación positiva entre estos compuestos y la altura máxima de la espuma (H_m), y negativa, en el caso de permanencia de la espuma (T_s), ambos parámetros medidos en el Mossalux ®.

El tiempo de permanencia es muy parecido en los dos tipos de vinos hasta los 15 meses, y es a los 18 meses, cuando se hace patente esta diferencia y se alcanzan valores muchos más altos en los PA.

Las variables que se correlacionan positivamente con el parámetro H_s , tienen una correlación negativa con el parámetro T_s , como también han comprobado otros autores (Pueyo y col., 1995b, Andrés-Lacueva y col., 1996 a y b).

3.10.4 Análisis de las características espumantes de los vinos espumosos elaborados con mezclas de variedades blancas y tintas.

Para comprobar el efecto que sobre las características espumantes tienen las mezclas de vinos base elaborados con variedades blancas y tintas, se llevó a cabo la determinación de uno de los parámetros más representativos de la calidad espumante de los vinos que es Hm , o altura a la que la espuma se estabiliza, además como se ha comprobado en la sección anterior existe una relación lineal entre el parámetro H_{pico} y Hm . En la figura 5, se muestra en diagrama de barras el valor medio de tres determinaciones realizadas con el equipo de medida de espuma mediante detector de ultrasonidos y guía de ondas. El vino base Tipus, es decir el vino elaborado con mezcla de variedades blancas, Macabeo, Xarel.lo y Parellada, que es el empleado para mezclar con los vinos base varietales elaborados con uvas tintas, Trepát y Monastrell, como se puede observar en la **figura 45a**, es el que tiene un valor más alto de Hm . Después estarían los vinos base elaborados con la variedad Trepát, y por último, los valores más bajos de Hm corresponden a los vinos base Monastrell, observándose diferencias entre el vino base Monastrell 2, y el vino base Monastrell 1, este último con valores más altos que el primero.

En la **figura 45 b**, se representa el valor de Hm en los vinos espumosos de 9 meses monovarietales y sus respectivas mezclas. Como se comprobó en el apartado anterior, no se producen cambios importantes en este parámetro en los vinos de 18 meses, por tanto, únicamente se muestran los valores correspondientes a los vinos espumosos de 9 meses de envejecimiento. Todos los vinos espumosos tienen valores de Hm menores que los respectivos vinos base, como ya se comentó en el apartado anterior. En esta figura puede observarse que las mezclas mejoran las características espumantes (medidas como Hm), respecto a los correspondientes vinos varietales. El único vino espumoso que no ha presentado importantes variaciones respecto a las mezclas, es el vino monovietal Trepát 2. Es de destacar que todos los vinos de mezcla tienen valores más altos de Hm que el vino espumoso Tipus. Es especialmente importante el aumento que en este parámetro se produce en los vinos de mezcla elaborados con la variedad Monastrell, a pesar de que están

elaborados con menor proporción (25%) de vino monovarietal Monastrell que los elaborados con la variedad Trepát (50 %).

Por tanto, se puede concluir que las mezclas de vinos base elaborados con variedades blancas y de vinos base elaborados con variedades tintas, mejora las características espumantes de los vinos espumosos de 9 meses de envejecimiento.

Resumiendo los aspectos más destacados del estudio de diferentes parámetros relacionados con la calidad de la espuma, y los factores que influyen en los mismos, se puede indicar que la cepa de levadura empleada en la segunda fermentación no influye en ninguno de los parámetros espumantes analizados. La bentonita añadida a los vinos, en cambio, produce una disminución de las características espumantes de los vinos. La segunda fermentación, y el tiempo de envejecimiento, tanto el comprendido entre los 40 y 365 días, como a partir de 365 días, hasta 18 meses, influye en los parámetros espumantes. Los principales cambios se producen desde el vino base hasta los 9 meses, en los que hay una disminución muy acusada de los parámetros H_{pico} y H_m . A partir de los 9 meses, estos cambios son menos acusados, y los parámetros tienden a estabilizarse. La H_{pico} y la H_m , muestran un comportamiento similar, excepto en los vinos espumosos rosados elaborados con Garnacha. Estos últimos son los que además han presentado mejores características espumantes. Las mezclas de vinos base elaborados con variedades blancas y tintas, mejora las características espumantes de los vinos espumosos de 9 meses, respecto a los vinos elaborados únicamente con mezclas de variedades blancas.

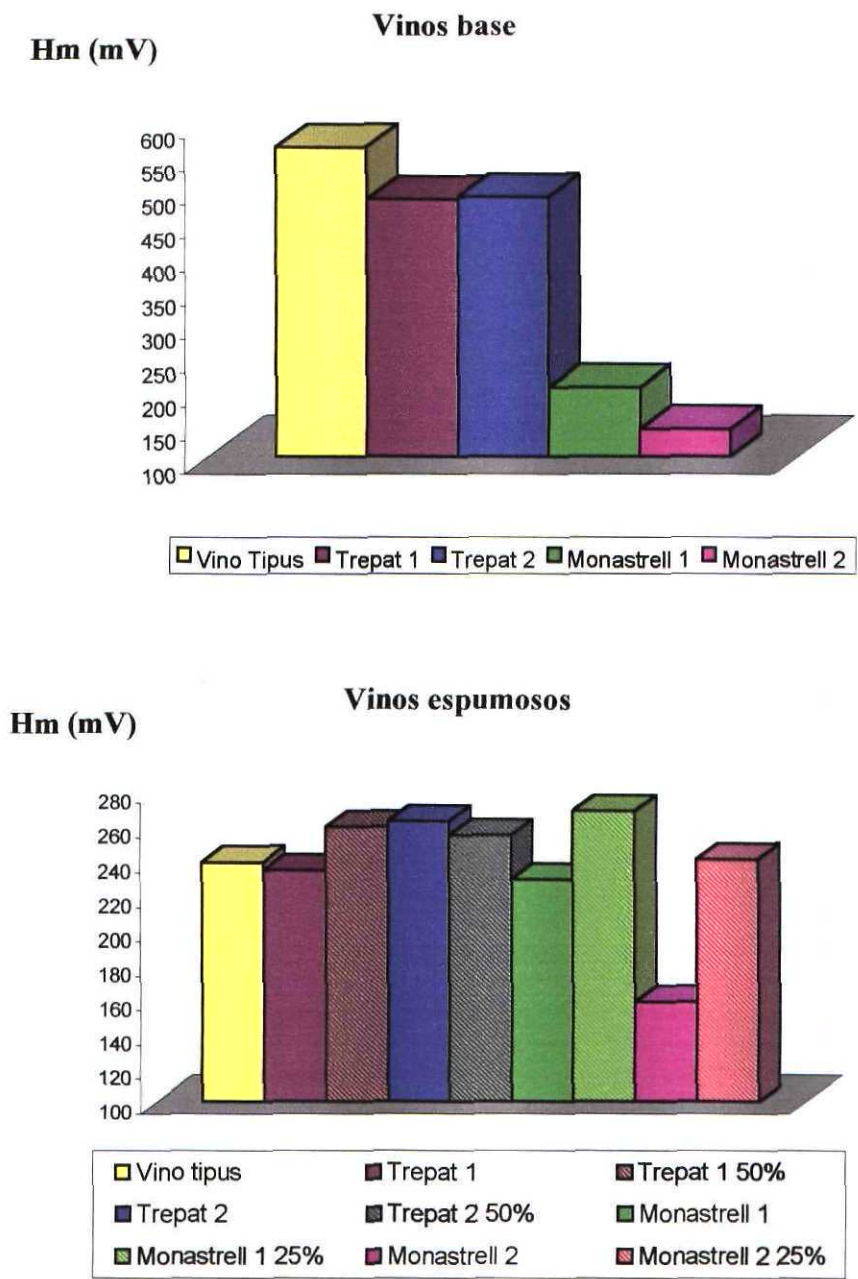


Figura 45. Valores medios del parámetro Hm en los vinos base y espumosos varietales y mezclas estudiados.

3.10.6 Estudio de correlación entre las distintas variables químicas analizadas en los vinos y los parámetros espumantes.

Para poder conocer la posible existencia de relaciones entre las características espumantes de los vinos y su composición química, se ha aplicado el Análisis de correlación canónica a los datos correspondientes a las determinaciones de la composición global, de los compuestos volátiles y de los fenoles de bajo peso molecular de todos los vinos estudiados en esta Memoria. Se han incluido además los datos de los antocianos de los vinos base y espumosos de los vinos procedentes de las variedades de uva tinta Trepát, Monastrell y Garnacha.

En la **tabla 47** se muestran las variables químicas que tienen un coeficiente de correlación mayor de 0,7 con los parámetros espumantes. Como se puede comprobar en la tabla 47, el grado alcohólico, es la única variable de las que forman parte de lo que hemos denominado composición global de los vinos que se tiene una relación mayor de 0,7 con los tres parámetros espumantes determinados, altura de pico (*Hp*), altura a la que la espuma se estabiliza (*Hm*) y la desviación estándar (*sd300*). Los compuestos volátiles que se correlacionan con los parámetros espumantes son los acetatos de isoamilo y de hexilo, y el octanoato y decanoato de etilo. Estos dos últimos compuestos junto con el acetato de hexilo, se relacionan positivamente con los tres parámetros espumantes. El acetato de isoamilo, sin embargo, se relaciona positivamente con *Hp* y *Hm*, mientras que tiene una correlación negativa con la *sd 300*. Los compuestos fenólicos de bajo peso molecular no parecen tener mucha influencia en las características espumantes, tan sólo los ácidos protocatéquico y vainillínico y el cis-caftárico, tienen coeficientes de correlación mayores de 0,7 con los valores de *sd300* y el triptofol con los valores de *Hm*. El grupo de compuestos que mas se correlaciona con los parámetros espumantes es el de los antocianos. Como se puede comprobar el grupo de glucósidos cumarílicos, y de antocianos complejos tiene correlación con la *Hp*. La variable formada por la suma de todos los antocianos analizados en cada uno de los vinos, se también se relaciona con la *Hp* y *Hm*.

Tabla 47. Coeficientes de correlación* entre las variables correspondientes a la composición química, compuestos volátiles, fenoles de bajo peso molecular, y antocianos, con los parámetros espumante Hp, Hm y sd 300.

Variables		Hp	H m	sd 300
<i>Composición química</i>	Grado alcohólico	-0,80	-0,78	-0,80
	Acetato de isoamilo	-0,93	-0,90	0,77
<i>Volátiles</i>	Acetato de hexilo	0,93	0,91	0,74
	Octanoato de etilo	0,89	0,90	0,76
	Decanoato de etilo	0,97	0,95	0,82
<i>Fenoles de bajo peso molecular</i>	Protocatéquico	-	-	0,78
	Vainillínico	-	-	0,97
	cis-Caftárico	-	-	0,81
	Triptofol	-	0,71	-
<i>Antocianos **</i>	Delfinidín glucósido	0,81	-	-
	Petunidín glucósido	0,71	-	-
	Vitisina A	0,70	-	-
	Complejo Antociano-procianidina I	0,72	-	-
	Peonidín acetyl glucósido	0,74	-	-
	Peonidín cumaroil glucósido	0,79	-	-
	Malvidín cumaroil glucósido	0,76	-	-
	Derivado malvidín-gucosa	-	-	0,90
	Derivado de alto peso molecular (III)	-	-	-
	Glucósidos cumárilicos	0,83	-	-
	Antocianos complejos	-	0,74	0,94
	Suma antocianos totales	0,74	0,72	

*: Se han seleccionado las variables que presentan un coeficiente de correlación mayor a 0,7 (en valor absoluto).

**: Para el cálculo de los coeficientes de regresión sólo se han tenido en cuenta los vinos base y espumosos elaborados con las variedades Trepát, Monastrell y Trepát.

El grado alcohólico se relaciona negativamente con los tres parámetros espumantes analizados. La viscosidad del medio parámetro está muy relacionado con el grado alcohólico del vino, y por tanto va a influir en el desprendimiento de CO₂ de los vinos. Cuanto mayor es el grado alcohólico de un vino, mayor es su viscosidad, y por tanto peor será el desprendimiento de CO₂.

Los compuestos volátiles que más se relacionan positivamente con los parámetros espumantes son el acetato de hexilo, el octanoato de etilo, y sobre todo, el decanoato de etilo. Estos dos últimos ésteres son compuestos lineales, formados por una larga cadena hidrocarbonada, de tipo hidrofóbico y el grupo carbonilo polar. Por tanto son moléculas anfotéricas. Algunos autores han determinado que estas moléculas forman aglomerados o micelas en soluciones acuosas (Tanford, 1980) y en soluciones modelo que contienen etanol, se ha determinado que tienen el mismo diámetro de micela que se ha encontrado en bebidas espirituosas (Paterson y col., 1994). Por tanto estas moléculas, se pueden disponer en el vino como vesículas o micelas, en las que podría quedar englobada una molécula de CO₂, formando una especie de complejo de inclusión que estabilizaría la espuma. Es decir actuarían como tensioactivos ya que un compuesto tensioactivo estabiliza el CO₂, porque disminuye la tensión superficial del líquido, y es capaz de formar agregados micelares que pueden encapsular CO₂ en su interior (Comelles, 1991).

Los compuestos que mejor se correlacionan con los parámetros espumantes, pertenecen al grupo de los antocianos. Hasta el momento actual no se había descrito que este grupo de compuestos tuvieran influencia en la calidad espumante de los vinos, sin embargo de forma empírica se sabe que los vinos tintos dan mejor espuma que los blancos. El estudio de las características espumantes de vinos elaborados con variedades tintas vinificadas en blanco, para extraer menos compuestos coloreados, y así poder realizar coupages con vinos blancos, ha sido uno de los objetivos de esta Memoria. Sin embargo, como se ha demostrado con el análisis de los parámetros espumantes de los vinos elaborados con variedades tintas vinificadas en blanco, y con variedades tintas vinificadas en rosado, son estos últimos, los vinos vinificados en rosado, los que tienen mejores

características espumantes. Por tanto se se desea mejorar la espuma de los vinos no es suficiente con utilizar una mezcla con variedades tintas sino que hay que hacerlo en unas condiciones que se extrigan los antocianos.

La explicación de por qué mejoran las características espumantes al aumentar la concentración de antocianos, podría ser similar a la comentada para los ésteres de cadena larga. Parece ser que la asociación de moléculas de alto peso molecular, como en este caso son los compuestos antociánicos podrían dar lugar a complejos de inclusión, que podrían atrapar moléculas de CO₂ en su interior, y de esta forma estabilizarlo.

4-Conclusiones

1 En la validación del método de HS-SPME puesto a punto para el análisis de los compuestos volátiles minoritarios de los vinos, se ha comprobado que:

La precisión es mejor del 10% para 11 de los 15 compuestos cuantificados, los límites de detección se encuentran comprendidos entre 0,002 y 1,390 mg/L, los coeficientes de determinación obtenidos en el cálculo de la linealidad del método fueron mejores de 0,900 y la recuperación media de todos los compuestos estudiados fue del 97%.

2 En el análisis de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular mediante el empleo de cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) con un detector de fotodiodos alineados y por acoplamiento con un detector de espectrometría de masas,

Se han identificado por primera vez en vinos espumosos siete compuestos derivados del ácido hidroxicinámico y siete flavonoideos.

3 Del estudio de los factores que influyen en la composición volátil de los vinos, se ha comprobado que:

La cepa de levadura utilizada en la segunda fermentación y la adición de bentonita en la solución de tiraje no influyen significativamente en ninguno de los compuestos volátiles analizados.

Los vinos procedentes de uvas cultivadas en las condiciones tradicionales tienen un contenido mayor de nueve de los veinte compuestos volátiles analizados que los procedentes de viñedos cultivados en condiciones de sobreexplotación.

4 Del estudio de los factores que influyen en la composición fenólica de los vinos, se ha comprobado que:

Los vinos procedentes de uvas de viñedos sometidos a condiciones de sobreexplotación, tienen mayor contenido de los ácidos hidroxicinámicos y de la mayoría de sus esteres, del *cis* resveratrol y de su glucósido y de ácido gálico.

Existen diferencias en la concentración de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular en función de la variedad de uva. El análisis cluster de los datos obtenidos tanto con las variedades de uva tinta como con las de uva blanca, ha permitido obtener agrupamientos entre los vinos en función de la variedad de uva de la que proceden.

Los compuestos fenólicos de bajo peso molecular no se modifican durante el envejecimiento con las levaduras

La composición en antocianos se modifica durante el envejecimiento de los vinos con las levaduras, produciéndose a largo del tiempo disminuciones e

incrementos lo que indica que se producen tanto reacciones de hidrólisis como polimerizaciones.

5 Del estudio de los factores que influyen en las características de la espuma, se ha comprobado que:

Los valores que alcanza la espuma del vino al pasar aire a su través son mayores en los vinos base que en los vinos espumosos. La existencia de una relación negativa entre el grado alcohólico y la formación de espuma de los vinos, explica que los vinos base den espuma de mejor calidad que los vinos espumosos.

Los vinos de variedades tintas vinificadas en blanco, no tienen mejor calidad de espuma que los de variedades blancas. Los vinos de la variedad Garnacha, vinificados en rosado, son los que han dado mejor calidad de espuma.

Se ha encontrado una relación de los compuestos antociánicos con la calidad de la espuma lo que explica que los vinos rosados de la variedad Garnacha sean los que han dado espuma de mejor calidad.

Si se desea mejorar la calidad de la espuma de los vinos a través de la utilización en los vinos base, de mezcla de uvas de variedades blancas y tintas, es necesario que se utilicen unas condiciones de vinificación que permitan extraer una cantidad suficiente de antocianos de las uvas tintas.

5-Bibliografia

- Almela, L., Lázaro I., López-Roca, J.M. (1991).** Influencia de las levaduras sobre el contenido de ácidos fenólicos de los vinos. *Rev. Agroquim. Tecnol. Aliment.*, 31, 393-399.
- Amati, A., Ferrarini, R., Giulivo, C., Catellari, M., Galli, M., Arfelli, G. (1998).** Influenza della fermentazione malolattica sui composti fenolici e sul colore dei vini rossi della Valpolicella. *Riv. Vitic. Enol.*, 3, 43-51.
- Andrés-Lacueva, C., López-Tamames, E., Lamuela-Raventós, R.M., Buxaderas, S., Torre-Boronat de la, M.C. (1996).** Characteristics of sparkling base wines affecting foam behaviour. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 989-995.
- Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R.M., Buxaderas, S., de la Torre-Boronat, M.C. (1997).** Influence of variety and aging on foaming properties of cava (sparkling wine). 2. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2520-2525.
- Archier, P., Coen, S., Roggero, J.P. (1992).** Phenolic contents of single variety wines. *Sci. Aliments*, 12, 453-466.
- Arpentine, G., Fernández, Y., Bourzeix, M., Mitjavila, S. (1992).** Relation entre la structure d'une série de proanthocyanidols et leur capacité à piéger le radical superoxide. *Bull. L Groupe Polyphenols*, 16, 237-240.
- Auwn, J.M., Blanco, V., O'Keefe, S.F., Sims, C.A. (1996).** Effect of processing on the phenolics and colour of Cabernet Sauvignon, Chambourcin and Noble wines and juices. *Am. J. Enol. Vitic.*, 47, 279-286.
- Aznar, M., López, R., Cacho, J., Ferreira, V. (2001).** Identification and quantification of impact odorants of aged red wines from Rioja. GC-olfatometry, quantitative GC-MS, and odor evaluation of HPLC fractions. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2924-2929.
- Baderschneider, B., Winterhalter, P. (2000).** Isolation and characterization of novel stilbene derivatives from Riesling wine. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2681-2686.

- Baderschneider, B., Winterhalter, P. (2001).** Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from Riesling wine and Screening for antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2788-2798.
- Baigorri, J., González, M., Herrero, L., Iñiguez, M., Rodríguez, E., Ruiz, M., Ruiz, R., Ventura, (1982).** La cata de vinos. Ed. Agrícola Española. Haro (Rioja).
- Bailey, D.G., Space, J.D., Muñoz, C., Arnold, J.M.O. (1991).** Interaction of fruit with felodipine and nifedipine. *Lancet*, 337, 268-269.
- Baranowsky, J.D., Nagel, C.W. (1981).** Isolation and identification of hydroxycinnamic acid derivatives in white Riesling wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 32, 5-13.
- Barcenilla, J., Estrella, I., Gómez-Cordovés, C., Hernández, T., Hernández, I. (1989).** The influence of yeasts on certain non-volatile components of wine. *Food Chem.*, 31, 177-187.
- Barón, R., Mayén, M., Mérida, J., Medina, M. (1997).** Changes in phenolic compounds and browning during biological aging of Sherry-type wine. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1682-1685.
- Bartolomé, B., Bengoechea, M.L., Gálvez, M.C., Pérez-Illarbe, F.J., Hernández, T., Estrella, I., Gómez-Cordovés, C. (1993).** Photodiode array detection for elucidation of the structure of phenolic compounds. *J. Chromatogr. A*, 665, 119-125.
- Bate-Smith, E.C. (1954).** Advances in food research. Vol V. Ed. Academic Press. New York.
- Bate-Smith, E.C., Swain, T. (1962).** *Comp. Biochem.*, 3, 755-809.
- Bertuccioli, M., Montedoro, G.F. (1981).** Use a Trebiano as a base wine for production of sparkling wines: analysis of some constituents connected with sensory characteristics. *Ind. Bevande*, 55, 368-374.

- Betés-Saura, C., Andrés-Laueva, C., Lamuela-Raventós, R.M. (1996).** Phenolics in white free run juices and wines from Penedés by high-performance liquid chromatography: changes during vinification. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 3040-3046.
- Blanch, G.P., Reglero, G., Herráiz, M., (1995).** Análisis of wine aroma by off-line and on-line supercritical fluid extraction gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 1251-1258.
- Blanch, G.P., Reglero, G., Herráiz, M., (1996).** Rapid extraction of wine arome compounds using a new simultaneous distillation-solvent extraction device. *Food Chem.*, 56, 439-444.
- Boehringer Mannheim S.A. (1975).** Métodos enzimáticos.
- Bourzeix, M., Weyland, D., Heredia, N. (1986).** Etude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. *Bull. OIV.*, 59, 1171-1254.
- Bradford, M.M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-255.
- Burda, S., Oleszek, W (2001).** Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2774-2779.
- Butler, W.L., Siegelman, H.W. (1959).** Conversion of caffeic acid to esculetin during paper chromatography. *Nature*, 183, 1813-1814.
- Cameira dos Santos, P.J., Brillouet, J.M., Cheynier, V., Moutounet, M. (1996) .** Detection and partial characterisation of new anthocyanin-derived pigments in wine. *J. Sci. Food Agric.*, 70, 204-208.
- Cavazza, A., Versini, G., Grando, M.S., Romano, F. (1990).** Variabilità indotta dai ceppi di lievito nella rifermentazione dei vini spumanti. *Ind. Bevande.*, 19 225-228.

Cayrel, A., Crouzet, J., Chan, H.W.S., Price, K.R. (1983). Evidence for the occurrence of lipoxigenase activity in grapes (variety Carignane). *Am. J. Enol. Vitic.*, 34, 77-82.

Charpentier, C., Feuillat, M. (1993). Yeast autolysis. En: *Wine Microbiology and Biotechnology*, Ch. 7. Fleet, G.H., Eds., Harwood Academic: Switzerland.

Chatonnet, P., Dubordieau D., Boidron, J., Pons, M. (1992). The origin of ethyl phenols in wines. *J. Sci. Food Agric.*, 60, 165-178.

Chatonnet, P., Dubordieau D., Boidron, J., Lavigne, V., (1993). The synthesis of volatile phenols by *S. cerevisiae* in wines. *J. Sci. Food Agric.*, 62, 191-202.

Chatonnet, P., Viala, C., Dubordieau, D. (1997). Influence of polyphenolic components of red wine on the microbial synthesis of volatile phenols. *Am J. Enol. Vitic.*, 48, 443-448.

Chen, E.C.H., Jamieson, A.M., VanGheluwe, G. (1980). The release of fatty acids as a consequence of yeast autolysis. *AAm. Soc. Brew. Chem.*, 38, 13-18.

Cheyrier, V., Rigaud, J. (1986). HPLC separation and characterization of flavonols in the skins of *Vitis vinifera* var. Cinsault. *Am. J. Enol. Vitic.*, 37, 248-252.

Cheyrier, V., Rigaud, J., Souquet, J.M., Barillere, J.M., Moutounet, M. (1989). Effect of pomace contact and hyperoxidation on the phenolic composition and quality of Grenache and Chardonnay wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 40, 36-42.

Cheyrier, V., Souquet, J.M., Kontek, A., Moutounet, M. (1996). Anthocyanin degradation in oxidising grape musts. *J. Sci. Food Agric.*, 66, 283-288.

Cheyrier, V., Rigaud, J., Moutounet, M. (1990). Oxidation kinetics of trans-cinnoyl tartrate and HS glutathione derivatives in grape must. *Phytochem.*, 29, 1751-1753.

Cheyrier, V., Massan, G., Rigaud, J., Moutounet, M. (1993). Estimation of must oxidation during pressing in champagne. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44.

Cilliers, J.J.L., Singleton, V.L. (1989). Nonenzymatic antioxidative phenolic browning reactions in a caffeic acid model system. *J. Agric. Food Chem.*, 37, 890-896.

Codornnier, R., Bayonove, C. (1979). Composants varietales et prefermentaires de l'aroma des vins. *Rev. Fr. Oenol.*, 74, 79-90

Codornnier R., Bayonove, C. (1980). Extraction et formation de certains composés de l'arome des vins. au cours de la phase prefermentaire de la vinification. *Symposium di Enologia S. Michelle all'Adige-Trento*. Temi-Tipolitografia Editrice-Trento, 66-86.

Codornnier, R., Bayonove, C. (1982). Etude de la phase préfermentaire de la vinification: extraction et formation de certains composés de l'arome; cas des terpenols, des aldehydes et des alcohols en C₆. *Conn. Vigne Vin*, 15, 269-286.

Colagrande, O., Ottina R. (1990). Lo spumante classico italiano. Metodo Champenois. *Enotecnico*, 3, 65-78.

Correa-Gorospe, I., Polo, M.C., Hernández, T. (1991). Characterization of the proteic and the phenolic fraction in tartaric sediments from wines. *Food Chem.*, 41, 135-146.

Cortés, M.B., Moreno, J., Zea, L., Moyano, L., Medina, M. (1998). Changes in aroma compounds of sherry wines during their biological aging carried out by *Saccharomyces cerevisiae* races *bayanus* and *capensis*. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2389-2394.

Cuinier, C. (1988). Influence des levures sur les composés phenoliques du vin. *Bull. OIV*, (689-690), 596-601.

Dallas, C., Ricardo da Silva, J.M., Laureano, O. (1996). Interactions of oligomeric procyanidins in model wine solutions containing malvidin-3-glucoside and acetaldehyde. *J.Sci.Food Agric.*, 70, 493-500.

De la Calle-García, D., Magnaghi, S., Reichenbacher, M., Danzer, K., (1996). Systematic optimization of the analysis of wine bouquet components by solid-phase microextraction. *J. High Resol. Chromatogr.*, 19, 257-262.

De la Calle-García, Reichenbacher, M., Danzer K., Hurlbeck, C., Bartsch, C., Karl-Heinz, F. (1997). Investigation of wine bouquet components by Solid-Phase-Microextraction-Capillary Gas Chromatography (SPME-CGC) using different fibers. *J. High. Resol. Chromatogr.*, 20, 665-668.

De la Calle-García, D., Reichenbacher, M., Danzer, K., Hurlbeck, C., Bartsch, C., Feller, K. H. (1998a). Análisis of wine bouquet components using headspace solid-phase microextraction-capillary gas chromatography. *J. High Resol. Chromatogr.*, 21, 373-377.

De la Calle-García, D., Reichenbacher, M., Danzer, K., Hurlbeck, C., Bartsch, C., Sèller, K., H. (1998b). Use of solid-phase microextraction-capillary-gas-chromatography (SPME-CGC) for varietal characterization of wines by means of chemometrical methods. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 360, 784-787.

De la Presa-Owens, C., Lamuela-Raventós, R.M., Buxaderas, S. (1995). Differentiation and grouping characteristics of vrietal grape musts from Penedes region. I. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 283-291.

Delaveau, F., Vidal-Tessier, A.M. (1986). Propriétés biologiques et pharmacologiques des quinones. *Bull. L Groupe Polyphenols*, 13, 299-303.

Delfini, C., Cocito, C., Bonino M. (1999). Mécanismes biochimiques et moléculaires chez *Saccharomyces cerevisiae* impliqués dans la formation de quelques composés volatils dans les vins. Revue bibliographique. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 33, 195-211.

Derks, W., Creasy, L.L. (1989). The significance of stilbene phytoalexins in the Plasmopara viticola-grapevine interaction. *Physiol. Plant. Pathol.*, 34, 189-202.

Dietrich, H., Pour Nirkfardjam, M., Patz, C.D. (1999). Importance and occurrence of resveratrol in red and white wines. In *Deutsches Weinbau-Jahrbuch*, Waldkircher Verlag: Waldkirch, Germany, pp 221-230.

Di Stefano, R. (1991). Proposition d'une methode de préparation de L'échantillon pour la determinacion des terpenos libres et glycosides des rains et des vins. *Bull OIV*, 721-722, 219-223.

Di Stefano, R., González-Sanjosé, M.L. (1991). Development of flavan and anthocyanins in a model solution and must. *Riv. Vitic. Enol.*, 44, 53-69.

Dizy, M. (1993). Estudio comparado de vinos obtenidos por fermentación espontanea e inducida en presencia y en ausencia de anhídrido sulfuroso. *Tesis doctoral*, Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias.

Doi, E., Shibata, D., Matoba, T. (1981). Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. *Anal. Biochem.*, 118, 173-184.

Drawert, F., Schreier P. (1978). Caracterisation des raisins et des vins a l'aide de certains constituants remarquables. *Ann. Technol. Agric.*, 27, 367-375.

Dry, I.B., Robinson, S.P. (1994). Molecular cloning and characterisation of grape berry polyphenol oxidase. *Plant Molecular Biology*, 26, 495-502.

Dufour, C., Bayonove, C.L. (1999). Interactions between wine polyphenols and aroma substances. An insight at the molecular level. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 678-684.

Dumenil, G., Vasquez, M., Cremieux, A., Balansard, G. (1980). Action antibactérienne des acides phénols de la série benzoïque. *Bull. L Groupe Polyphénols*, 10, 302-304.

Dye, I.B. and Robinson, P. (1994). Molecular cloning and characterization of grape berry polyphenol oxidase. *Plant. Mol. Biol.*, 26, 495-502.

Edeas, M.A., Lindenbaum, A. (2000). Protective effects of various flavonoid compounds on HIV infection. *Bull. OIV*, (837-838), 810-818.

- Escalona, E., Birkmyre, L., Piggott, J.R., Paterson, A. (2001).** Relationship between sensory perception, volatile and phenolic components in commercial spanish red wines from different regions. *J. Inst. Brew.*, 107, 157-166.
- Escribano-Bailón, T., Dangles, O., Brouillard, R. (1996).** Coupling reactions between flavylum ions and catechin. *Phytochem.*, 41, 1583-1592.
- Estrella, I., Hernández, T., Díez, C. (1983).** Evoluzione dei composti di basso peso molecolare durante la maturazione di vini di Jerez. *Vignivini*, I-II, 33-38.
- Estrella, I., Hernández, T., Díez de Bethencourt, C. (1984).** Composition phénolique des pellicules du raisin. Différences selon la variété. *Bull. L. Groupe Polyphénols*, 12, 137-141.
- Fabios, M., López-Toledano, A., Mayen, M., Mérida, J., Medina, M. (2000).** Phenolic compounds and browning in Sherry wines subjected to oxidative and biological aging. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 2155-2159.
- Fernández de Simón, B., Pérez-Ilzarbe, J., Hernández, T., Gómez-Cordovés, C., Estrella, I. (1990).** HPLC study of the efficiency of extraction of phenolic compounds. *Chromatogr.*, 30, 35-37.
- Fernández de Simón, B., Estrella, I., Hernández, T. (1995).** Flavonoid separation by capillary electrophoresis. Effect of temperature and pH. *Chromatogr.*, 41, 389-392.
- Fernández-Zurbano, P., Ferreira, V., Escudero, A., Cacho, J. (1998).** Role of hydroxycinnamic acids and flavanols in the oxidation and browning of white wines. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4937-4944.
- Ferrari, S., Gheri, A., Rosi I., Trioli, G. (1997).** Polisaccaridi del lievito e polifenoli. *Vignevini*, (7-8), 43-45.
- Ferreira, V., Rapp, A., Cacho, F.J., Hastrich, H., Yavas, I. (1993).** Fast and quantitative determination of wine flavor compounds using microextraction with Freon 113. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1413-1420.

- Ferreira, V., Hernández-Orte, P., Escudero A., López, R., Cacho, J. (1999).** Semipreparative reversed-phase liquid chromatographic fractionation of aroma extracts from wine and other alcoholic beverages. *J. Chromatogr A*, 864, 77-88.
- Feuillat, M., Charpentier C. (1982).** Autolysis of yeast in Champagne. *Am. J. Enol. Vitic.*, 33, 6-13.
- Flanzy, C. (2000).** Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos. Ed. Mundi Prensa.
- Fleuriet, A., Macheix, J.J. (1972).** Séparation et dosage par chromatographie en phase gazeuse de l'acide chlorogénique et des catéchines des fruits. *J. Chromatogr.*, 74, 339-345.
- Foo, L.Y. (1981).** Proanthocyanidins: gross chemical structures by infra-red spectra. *Phytochem.*, 20, 1397-1402.
- Francia-Aricha, E.M., Guerra, M.T., Rivas-Gonzalo, J.C., Santos-Buelga, C. (1997).** New anthocyanin pigments formed after condensation with flavanols. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2262-2266.
- Francis, F.J. (1989).** Food colorants: anthocyanins. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28, 273-314.
- Frankel, E.N.; Waterhouse, A.L., Kinsella, J.E. (1993).** Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet*, 341, 1103-1104.
- Fulcrand, H., Cameira-dos-Santos, P.J., Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., Favre-Bonvin, J. (1996a).** Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 735-739.
- Fulcrand, H., Benabdeljalil, C., Rigaud, J., Cheynier, V., Motounet, M. (1998).** A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochem.*, 47, 1401-1407.

García, C., Cela, R., Pérez-Bustamante, J.A. (1986). Evolution of phenolic acids and aldehydes during the different production of "Fino" Sherry wine". *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 182, 413-418.

García-Jares, C., García-Martín S., Cela-Torrijos R. (1995). Analysis of some highly volatile compounds of wine by means of Purge and Cold Trapping Injector Capillary Gas Chromatography. Application to the differentiation of Rias Baixas spanish white wines. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 764-768.

García-Varela, C., Tomás-Barberán, A., Ferreres, F., Artés, F., Tomás-Lorente, F. (1993). Determination of citrus jams genuineness by flavonoid analysis. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 197, 255-259.

García-Viguera, C., Bridle, P. (1995). Analysis of non-coloured phenolic compounds in red wines. A comparison of high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis. *Food Chem.*, 54, 349-352.

Garofolo, A., Morassut, M., Ciolfi G. (1990). Composition of the sparkling wine base in relation to the metabolism of strains of different species. *Ind. Bevande*, 19, 388-393.

Gehm, B.D., McAndrews, J.M., Chein, P.Y., Jameson, J.L. (1997). Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 14138-14143.

Gerbi, V., Zeppa G., Milanaccio, G. E., Rissone M. (1990). Verifica mediante analisi sensoriale dell'effetto di lieviti e chiarificanti diversi nella produzione di uno spumante classico. *Ind. Bevande*, 19, 488-491.

Gerbi, V., Zeppa, G., Carnacini A. (1992). Rapid extraction of volatile compounds in wine and vinegar using xtrelet resin. *Ital. J. Food Sci.*, 4, 259-267.

- Ghiselli, A., Nardini, M., Baldi, A., Scaccini, C. (1998).** Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an italian red wine. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 361-367.
- Giudici, P., Romano, P., Zambonelli, C. (1990).** A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Canadian J. Microbiol.*, 36, 61-64.
- Goldberg, D.M., Tsang, E., Karumanchiri, A., Diamandis, E.P., Soleas, G., Ng, E. (1996a).** Method to assay the concentration of phenolic constituents of biological interest in wines. *Anal. Chem.*, 68, 1688-1694.
- Goldberg, D.M., Ng, E., Karumanchiri, A., Diamandis, E.P., Soleas, G.J. (1996b).** Resveratrol glucosides are important components of commercial wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 47, 415-420.
- Goldberg, D.M., Tsang E., Karumanchiri, A., Soleas, G.J. (1998).** Quercetina and p-coumaric acid concentrations in commercial wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 49, 142-151.
- Goldberg, D.M., Karumanchiri, A., Soleas G.J., Tsang, E. (1999).** Concentrations of selected polyphenols in white comercial wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50, 185-191.
- Gómez, E., Martinez, A., Laencina, J. (1995).** Changes in volatile compounds during maturation of some grape varieties. *J. Sci. Food Agric.*, 67, 229-233.
- Gómez-Cordovés, C., Garrido, D., Díez, C. (1978).** Étude des composés phénoliques des eaux-de-vie vieilles en bois de chêne. *Bull. L. Groupe Polyphénols*, 8, 369-373.
- Gómez-Cordovés, C., Khayyat, N. (1981).** Efecto de levaduras sobre los aldehídos y ácidos fenólicos presentes en mostos de uvas españolas. *Anal. Bromatol.*, 33, 143-148.
- Gómez-Cordovés, C., González-SanJosé, M.L. (1995).** Interpretation of color variables during the aging of red wines: Relationship with families of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 557-561.

González-SanJosé, M.L., Pérez-Illarbe, F.J. (1990). Ventajas del Sep-Pak sobre la cromatografía en columna en la separación de compuestos fenólicos de *R. Simsii*. *Chromatogr. Tec. Afines*, 11, 83-85.

González-SanJosé, M.L., Santa-María, G., Díez, C. (1990). Anthocyanins as parameters for differentiating wines by grape variety, wine-growing region and wine-making methods. *J. Food Comp. Analysis*, 3, 54-66.

Goodner, K.L., Rouseff, R.R.L. (2001). Using an ion-trap MS sensor to differentiate and identify individual components in grapefruit juice headspace volatiles. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 250-253.

Goody, A. R. and Tubb R.S. (1992). Genetic and biochemical analysis of the ability of *S. cerevisiae* to decarboxylate cinnamic acids. *J. Gen Microbiol.*, 128, 2615-2620.

Gordillo M., (1990) Contribución al estudio de la materia nitrogenada en vinos espumosos de cava y su incidencia en la composición aromática. *Sem. Vitivinic.*, 2265, 9-11.

Gramatica, P., Ranzi, B., Mannito, P. (1982). Decarboxylation of cinnamic acids *S. cerevisiae*. *Biorg. Chem.*, 10, 21-24.

Guillou, C., Aleixandre, J. L., García, M.I., Lizana, V. (1998). Classification influence upon sensorial and analytical characteristics of muscat dry wine. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 32, 111-119.

Günata, Y.Z., Sapis, J., Moutounet, M. (1986). Substrates and aromatic carboxylic acid inhibitors of grapes phenol oxidase. *Phytochem.*, 26, 1-3.

Günata, Y.Z., Sapis, J.C., Moutounet, M. (1987). Substrates and aromatic carboxylic acid inhibitors of grape phenoloxidases. *Phytochem.*, 26, 1573-1575.

Günata, Y.Z., Dugelay, I., Sapis, J. C., Baumes R., Bayonove, C. (1990). Action des glycosidases exogènes au cours de la vinification: Libération de l'arome a partir de précurseurs glycosidiques. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 24, 133-144.

Harbone, J.B., Simmonds, N.W. (1964). Biochemistry of phenolic compounds. Ed. Academic Press. New York.

Haslam, E. (1980). In vino veritas: oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochem.*, 19, 2577-2582.

Hayasaka, Y., Bartowsky, E.J. (1999). Analysis of diacetyl in wine using solid-phase microextraction combined with gas-chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food. Chem.*, 47, 612-617.

Hebrero, E., Santos-Buelga, C., Rivas, J.C. (1988). High-performance-liquid chromatography-diode array spectroscopy identification of anthocyanins of *Vitis vinifera* variety Tempranillo. *Am. J. Enol. Vitic.*, 39, 227-233.

Hermann, K. (1990a). Significance of hydroxycinnamic acid compounds in food. I. Antioxidant activity. Effects on the use, digestibility, and microbial spoilage of food. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, 12, 137-144.

Hermann, K. (1990b). Significance of hydroxycinnamic acid compounds in food. II. Effects on the activity of food enzymes, alleged anti-thiamine effect, bitter taste, pharmacological effectiveness and therapeutic uses, and significance as mutagens and anti-carcinogens. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.*, 12, 161-167.

Hernández, T., Ausín, N., Estrella, I., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Bengoechea, L., Pérez-Illarbe, F.J. (1995). Phenolic compounds in fruit juices. Variations with different treatments. En: Polyphenols 94 (Les Colloques, n° 69). Ed. R. Brouillard, M. Jay y A. Scalbert. INRA. París.

Herraiz, T. (1989). Formación de compuestos volátiles por distintas levaduras vínicas. Influencia del SO₂ y de los hollejos utilizados durante la fermentación. *Tesis doctoral*, Univerisdad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias.

Herraiz, T., Martín-Alvarez, P., Reglero, G., Herraiz M., Cabezudo, M.D. (1989). Differences between wines fermented with and without SO₂ using different selected yeasts. *J. Sci. Food Agric*, 49, 249-258.

Herraiz, T., Martín-Alvarez, P.J., Reglero, G., Herráiz, M., Cabezudo, M.D., (1990). Effects of the presence of skins during alcoholic fermentation on the composition of wine volatiles. *Vitis*, 29, 239-249.

Herraiz, T., Ough, C. (1993). Formation of ethyl esters of amino acids by yeast during the alcoholic fermentation of grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, 41-48.

Herrick, I.W., Nagel, C.W. (1985). The caffeoil tartrate content of white Riesling wines from California, Washington and Alsace. *Am. J. Enol. Vitic.*, 36, 95-97.

Hollborn, E., Wald, B., Galensa, R., Herrmann, K. (1990). Nachweis von apfelbestandteilen in lebensmitteln mittels HPLC nach festphasenextraction. *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, 86, 1-3.

Hong, V., Wrolstad, R.E. (1990a). Characterization of anthocyanin-containing colorants and fruit juices by HPLC/ptotodiode array detection. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 698-708.

Hong, V., Wrolstad, R.E. (1990b). Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanins. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 708-715.

Ibern-Gómez, M., Andrés-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R.M., Buxaderas, S., Singleton, V.L., de la Torre-Boronat, M.C. (2000). Browing of cava (sparkling wine) during aging in contact with lees due to phenolic composition. *Am. J. Enol. Vitic.*, 51, 29-36.

- Iacono, F., Bertamini M., Dalla Serra, A., Falcetti, M., Porro, G., Versini. (1990).** Use of chemical and sensorial analysis in the characterization of Chardonnay base wine produced in different Trentino environments. *Riv. Vitic. Enol.* 4,3-14.
- Jang, M., Ci, L., Udeni, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W.W., Fong, H.H.S., Faarnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C., Pezzuto, J.M. (1997).** Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 218-220.
- Jeandet, P., Sbaghi, M., Bessis, R. (1992).** The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grapevine in vitro cultures, and its application to screening for grey mould resistance. *J. Wine Res.*, 3, 47-57.
- Jeandet, P., Bessis, R., Maume, B.F., Sbaghi M. (1993).** Analysis of resveratrol in Burgundy wines. *J. wines Res.*, 4, 79-85.
- Jeandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M., Meunier, P., Trollat, P. (1995).** Resveratrol content of wines of different ages: relationship with fungal disease pressure in the vineyard. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 1-4.
- Josling, W. S., Ough C. S. (1978).** Cause and fate of certain C₆ compound formed enzymatically in macerated grape leaves during harvest and wine fermentation. *Am. J. Enol Vitic.* 29, 11-17.
- Kanz, K., Singleton, V.L. (1990).** Isolation and determination of polymeric polyphenols using Sephadex LH-20 and analysis of grape tissue extracts. *Am. J. Enol. Vitic.*, 41, 223-228.
- Kimura, S., Yasuda, T., Okamoto, T. (1985).** Studies on chilling injury of apples. VII. Existence of acetaldehyde in mitochondria from pulp of starking delicious after cold storage. *Bulletin of the Faculty of Agriculture. Hirosaki University.* 43, 1-6.
- Lamikanra, O., Grimm, C.C., Rodin, J. B., Inyang, D. (1996).** Hydroxylated stilbenes in selected American wines. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 1111-1115.

Lamuela-Raventós, R.M., Waterhouse, A.L. (1994). A direct HPLC separation of wine phenolics. *Am. J. Enol. Vitic.*, 45, 1-5.

Lamuela-Raventós, R.M., Romero-Pérez A.I., Waterhouse A.L., De La Torre, C. (1995). Direct HPLC analysis of cis- and trans-resveratrol and piceid isomers in spanish red *Vitis vinifera* wines. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 281-283.

Langcake, P., Pryce, R.J. (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant. Pathol.*, 9, 77-86.

Laparra, J. (1990). Les procyanidines du vin. Action inhibitrice sur les radicaux libres oxigénés. En: *Actualités oenologiques* 89. Ed. Dunod, París. Pp. 392-397.

Lea, A.G.H. (1980). Reversed-phase gradient high performance liquid chromatography of procyanidins and their oxidation products in ciders and wines optimised by Sunder's procedures. *J. Chromatogr.*, 194, 62-68.

Lee, C.Y., Jaworski, A.W. (1989). Major phenolic compounds in ripening white grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, 40, 43-46.

Lee, C.Y., Jaworski, A.W. (1990). Identification of some phenolics in white grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, 41, 87-89.

Liao, H., Cai, Y., Haslam, E. (1992). Polyphenol interactions. Anthocyanins: copigmentation and colour changes in red wines. *J. Sci. Food Agric.*, 59, 299-305.

López, M., Martínez, F., Del Valle, C., Orte, C., Miró, M. (2001). Analysis of phenolic constituents of biological interest in red wines by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 922, 359-363.

Loyaux, D., Roger, S. Adda, J. (1981). The evolution of champagne volatiles during ageing. *J. Sci. Food Agric.*, 32, 1254-1258.

Lubbers, C., Charpentier, C., Feuillat M., Voilley A. (1994). Influence of yeast walls on the behaviour of aroma compounds in a model wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, 45, 29-33.

Lubbers, S., Charpentier, C., Feuillat, M. (1996). Etude de la rétention de composés d'arôme par les bentonites en moût, vin et milieux modèles. *Vitis*, 35, 59-62.

Lurton, L. (1998). Etude de la proteolyse des levures de vinification lors de l'élevage d'un vin sur ses lies. *Cahier Scientifique*, 113, 35-41.

Mabry, T.J., Ulubelen, A. (1980). Chemistry and utilization of phenylpropanoids including flavonoids, coumarins and lignans. *J. Agric. Food Chem.*, 28, 188-196.

Macheix, J.J, Fleuriet, A. (1986). Les dérivés hydroxycinnamiques des fruits. *Bull. L. Groupe Polyphénols*, 16, 337-351.

Marston, A., Slacanin, I., Hostettmann, K. (1990). Some new developments in centrifugal partition chromatography and applications in the separation of natural products. *J. Liq. Chromatogr.*, 13, 3615-3624.

Martínez-Rodríguez, A. (2000). Estudio de la autólisis de las levaduras durante la elaboración de vinos de cava. *Tesis Doctoral*. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid.

Martínez-Rodríguez, A., Carrascosa, A.V., Polo, M.C. (2001). Release of nitrogen compounds to the extracellular medium by three strains of *Sacchromyces cerevisiae* during induced autolysis in a model wine system. *Int. J. Food Microb.*, 68, 155-160.

Mateo, J.J., Jiménez, M., Huerta, T., Pastor, A. (1991). Contribution of different yeasts isolated from musts of monastrell grapes to the aroma of wine. *Int. J. Food Microb.*, 14, 153-160.

Maujean, A., Poinaut, P., Dantan, H., Brissonet, F., CoE. (1990). Étude de la tenue et de la qualité de mousse des vins effervescent II. Mise au point d'une technique de

mesure de la moussabilité de la tenue et de la stabilité de la mousse des vins effervescents. *Bull OIV*, 63, 405-427.

Mauricio, J.C., Moreno, J.J., Ortega, J.M. (1997). In vitro specific activities of alcohol and aldehyde dehydrogenases from two flor yeasts during controlled wine aging. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 1967-1971.

Mayen, M., Mérida, J., Medina, M. (1995). Flavonoid and non-flavonoid compounds during fermentation and post-fermentation standing of musts from Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 255-261.

Mazza, G., Brouillard, R. (1990). The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochem.*, 29, 1097.

Mazzolenni, V., Colagrande, O. (1993). Composition of bottle-fermented Italian Sparkling wines. *Ital. J. Food Sci.*, 5, 129-137.

McClure, J.W. (1975). Physiology and function of flavonoids. En: Biochemistry of plant phenolics (Rec. Adv. Phytochem. 12). Eds. T. Swain, J.B. Harbone, C.F. Van sumere. Plenum Press. New York.

Miranda-López, R., Libbey L.M., Watson B. T., Mc Daniel, M. R., (1992). Identification of additional odor-active compounds in Pinot noir wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 43.

Mólnar, I., Oura, E., Suomalainen, H. (1981). Study of volatile substances produced during the autolysis of champagne yeast. *Acta Alimentaria* 10, 27-36.

Moreno-Arribas, V., Pueyo, E., Polo, M.C. (1996). Peptides in musts and wines. Changes during the manufacture of cavas (sparkling wines). *J. Agric. Food Chem.*, 44, 3783-3788.

- Moreno-Arribas, V., Pueyo, E., Polo, M.C., Martín-Alvarez, P.J. (1998).** Changes in the amino acid composition of the different nitrogenous fractions during the aging of wine with yeasts. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4042-4051.
- Moreno-Arribas, V., Pueyo, E., Nieto, F.J., Martín-Alvarez, P.J., Polo, M.C. (2000).** Influence of the polysaccharides and the nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. *Food Chem.*, 70, 309-317.
- Moretti, S., Garofolo, A. (1991).** Produzione di vini spumanti con lieviti diversi: Influenza delle condizioni di conservazioni. *Enotecnico*, 27, 69-78.
- Morrot, G., Brochet F. (1999).** What our nose can tell us. *J. Int. Sci. Vigne Vin*. Special issue, 15-17.
- Moutounet, M. (1969).** Biosynthesis of higher alcohols in fermented drinks. *Ann. Techn. Agric.*, 18, 241-261.
- Nagel, C.W., Wulf, L.W. (1979).** Changes in the anthocyanins, flavonoids and hydroxycinnamic acid esters during fermentation and aging of Merlot and Cabernet Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.*, 30, 111-116.
- Nicolosi, A., Cataldi, L.M.C., Campisi, S. (1995).** La componente aromatica di uno spumante champenois prodotto da uve Nerello Mascalese. *Ind. Bevande*, 24, 247-250.
- Noble, C. A., Flath, A. R., Forrey, R. (1980).** Wine headspace analysis. Reproducibility and application to varietal classification. *J. Agric. Food Chem*, 28, 346-353.
- Nykaenem, L.(1986).** Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *Am. J. Enol. Vitic.*, 37, 84-96.
- Obiols, J.M., De la Presa-Owens, C., Buxaderas, S., Bori, J.L., De la Torre-Boronat, C. (1998).** Protocolo de evaluación de la formación de la efervescencia y espuma en un vino espumoso. *ACE, Revista d'Enologia*, 44.

Oficina Internacional de la Viña y el Vino, París. (1993). Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des mouûts.

Okamura, S., Watanabe, M. (1981). Determination of phenolic cinnamates in white wine and their effect on wine quality. *Agric. Biol. Chem.*, 45, 2063-2066.

Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T., Mori, K., Fukuda, T. (1990). Fractionation of pharmacologically active plant polyphenols by centrifugal partition chromatography. *J. Liquid Chromatogr.*, 13, 3637-3650.

Orden del de 1970. Estatuto de la Viña, del Vino y de los Alcoholes.

Orden del 14 Noviembre de 1991. Reglamentación de la Denominación Cava y de su Consejo Regulador. Boletín Oficial del Estado nº 278 (20 Noviembre de 1991), pp. 37587-37593.

Ortega, C., López, R., Cacho, J., Ferreira, V. (2001). Fast analysis of important wine volatile compounds. Development and validation of new method base on gas chromatographic-flame ionisation detection analysis of dichloromethane microextracts. *J. Chromatogr. A*, 923, 205-214.

Paul, F. (1958). *Mitt. Klosterneuburg, Rebe u Wein, ser. A*, 821.

Pedrielli, P., Pedulli, G F., Skibsted, L.H. (2001). Antioxidant mechanism of flavonoids. Solvent effect on rate constant for Chain-breaking reaction of quercetin and epicatequin in autoxidation of methyl linoleato. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 3034-3040.

Peña-Neira, A., Hernández, T., García-Vallejo, C., Estrella, I., Suárez, J.A. (2000). A survey of phenolic compounds in Spanish wines of different geographical origin. *Eur. Food Res. Technol.*, 210, 445-448.

Pérez-Coello, M.S., González-Viñas, M.A. (1995). Nuevas tendencias en el análisis de los vinos por cromatografía de gases. *Cromatogr. Tec. Afines*, 16, 39-45.

Pérez-Illarbe, J., Hernández, T., Estrella, I. (1991). Phenolic compounds in apples: varietal differences. *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 192, 551-554.

Perin, J., Llorca, C. (1974). Allene general de l'évolution des matières azotées au cours de la vinification et de la champagnisation. *Vigneron Champenoise*, 7-8, 272-278.

Pezet, R., Curnat, P. (1996). Resveratrol in wine: extraction from skin during fermentation and post-fermentation standing of must from Garnay grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, 47, 267-290.

Picinelli, A., Suárez, B., Mangas, J.J. (1996). Comparative study of the fractionation and extraction of polyphenols in apple products by solid phase and liquid-liquid extraction with ethyl acetate. En: *Polyphenols Communications 96. Volumen 1*. Eds. J. Vercauteren, C. Chèze, M.C. Dumon, J.F. Weber.

Pigella, R., Bossa, A., Di Stefano, R., Corina, L., Malerba, G. (1998). Caratterizzazione varietale del Pinot nero attraverso lo studio dei polifenoli e dei precursori d'aroma. *Riv. Vitic. Enol.*, 1, 45-62.

Piracci, A., Lovino, R., Scazzariello M. (1992). Prove di spumantizzazione di vino Moscato Bianco con lieviti immobilizzati. *Vini d'Italia*, 38, 27-28.

Piretti, M.V., Ghedini, M., Serrazanetti, G. (1976). Isolation and identification of the polyphenolic and terpenoid constituents of *Vitis vinifera*. *Ann. Chim.*, 66, 429-437.

Porter, L.J., Ma, Z., Chang, B.G. (1991). Cocoa procyanidins: major flavonoids and identification of some minor metabolites. *Phytochem.*, 31, 1675-1663.

Postel, W., Ziegler, L. (1991). Influence of the duration of yeast contact and of the manufacturing process on the composition and quality of sparkling wines. *Wein-Wiss.*, 46, 26-32.

Pourrat, H. (1980). Les drogues a tannins dans la pharmacologie moderne. *Bull. L. Groupe Polyphénols*, 10, 33-40.

Pueyo E., (1994). Identificación, origen y modificaciones de los compuestos que influyen sobre las características espumantes de los vinos "cava". *Tesis doctoral*, Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias.

Pueyo, E., Martín-Alvarez, P.J., Polo, M.C. (1995). Relationship between foam characteristics and chemical composition in wines and cavas (spaarkling wines). *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 518-524.

Pueyo, E., Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. (1996). Aspectos fisico-químicos de la formación de burbujas en vinos espumosos. *Alimentación Equipos y Tecnologías*, 73-77.

Puig-Deu, M., López-Tamames, E., Buxaderas, S., Torre-Boronat, M.C. (1999). Quality of base and sparkling wines as influenced by type of fining agent added prefermentation. *Food Chem.*, 66, 35-42.

Quintana-Gana, M., Gómez-Piñol, J.M. (1989). Influence des sols, de la climatologie et d'autres facteurs sur le conteneu phénolique du raisin de la variété Xarello. *Bull OIV*, 701-702, 486-497.

Ramey, D., Ough, C., (1980). Volatile esters hydrolysis of formation during storage of model solutions and wines. *J. Agric. Food Chem.*, 28, 928-934.

Rathjen, A.H., and Robinson S.P. (1992). Aberrant processing of polyphenol oxidase in a variegated grapevine mutant. *Plant Physiol.*, 99, 1619-1625.

Ravaglia, S., Delfini C. (1994). Inhibitory effects of medium chain fatty acids on yeast cells growing in sintetic nutrients medium and in the sparkling Moscato wine "Asti spumante". *Wein-Wiss.*, 49, 40-45.

Razungles, A., Tarhi, E. H., Baumes, R., Gunata, Z., Tapiero, C., Bayonove, C. (1994). Rapid analysis of volatile compounds of grapes and wines by microwave extraction. *Sci. Aliments*, 14, 725-739.

Reguant, C., Bordons, A., Arola, L., Rozès, N. (2000). Influence of phenolic compounds on the physiology of *Oenococcus oeni* from wine. *J. Appl. Microbiol.*, 88, 1065-1071.

Revilla, I., Pérez-Magariño, M.L., González-SanJosé, M.L., Beltrán, S. (1999). Identification of anthocyanin derivatives in grape skin extract and red wines by liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*, 847, 83-90.

Ribeiro de Lima, M.T., Waffo-Tégou, P., Teissedre, P.L., Pujolas, A., Vercauteren, J., Cabanis, J.C., Mérillon, M. (1999). Determination of stilbenes (trans-Astringin, cis- and trans-piceid, and cis- and trans-resveratrol) in portuguese wines. *J. Agric. Food Chem.*, 47, 2666-2670.

Ribéreau-Gayón, P. (1968). Les composés phénoliques des végétaux. Ed. Dunod. Paris.

Ribéreau-Gayón, P., Peynaud, E. (1971). Science et technique de la vigne. Ed. Dunod. Paris.

Ribéreau-Gayón, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A. (2000). Handbook of enology, Vol. I. The Microbiology of Wine and Vinifications. John Wiley and Sons Ltd. Baffins Lane, Chichester, West Sussex PO19 1UD, England. Chapter 14. (Other Winemaking methods) pp 422-424.

Ricardo da Silva, J.M., Rosec, J.P., Bourzeix, M., Heredia, N. (1990). Separation and quantitative determination of grape and wine procyanidins by high performance reversed phase liquid chromatography. *J. Sci. Food Agric.*, 53, 85-92.

- Ricardo da Silva, J.M., Darmon, N., Fernández, Y., Mitjavila, S. (1993).** Effect of pomace contact, carbonic maceration and hyperoxidation on the procyanidin composition of Grenache blanc wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, 168-172.
- Roggero, J.P., Ragonnet, B., Coen, S. (1984).** Analyse fine des anthocyanes des vins et des pellicules de raisin par la technique HPLC, étude de quelques cépages meridionaux. *Vignes Vins*, 327, 38-40.
- Roggero, J.P.;García-Parrilla, C. (1995).** Effects of ultraviolet irradiation on resveratrol and changes in resveratrol and various of its derivates in the skins of ripening grapes. *Sci. Aliments*, 15, 411-422.
- Romeyer, F.M., Macheix, J.J., Goiffon, J.P., Reminiac, C.C., Sapis, J.C. (1983).** The browning capacity of grapes, 3. Changes and importance of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters during development and maturation of the fruit. *J. Agric. Food Chem.*, 31, 346-349.
- Salagoity-Auguste, M.H., Bertrand, A.J. (1984).** Wine phenolics analysis of low molecular weight components by HPLC. *J. Sci. Food Agric.*, 35, 1241-1247.
- Salinas, R. M., Gonzalo, L.A., Esteban-Infantes, F. J., (1994).** Adsorption-thermal desorption-gas chromatography applied to the determination of wine aromas. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1328-1331.
- Santos, C., Muñoz, S.S., Gutierrez, Y., Hebrero, E., Vicente, J.L., Galindo, P., Rivas, J.C. (1991).** Characterization of youngh red wines by application of HJ biplot analysis to anthocyanin profiles. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 1086-1090.
- Sato, M., Suzuki, Y., Okuda, T., Yokotsuka, K. (1997).** Content of resveratrol, piceid, and their isomers in commercially available wines made from grapes cultivated in Japan. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1800-1805.
- Servili, M., De Stefano, G., Piacquadio, P., Sciancalepore, V. (2000).** A novel method for removing phenols from grape must. *Am. J. Enol. Vitic.*, 51, 357-361.

- Shinohara, T. (1985).** Gas chromatographic analysis of volatile fatty acids in wines. *Agric. Biol. Chem.*, 49, 2211-12.
- Silva, A., Fumi, M. D., Montesissa, G., Colombi, M.G., Colagrande O. (1987).** Incidence de la conservation en présence de levures sur la composition des vins mousseux. *Connaiss. Vigne Vin*, 21 141-162.
- Simpson, R.F. (1982).** Factors affecting oxidative browning of white wine. *Vitis*, 21, 233-239.
- Simpson, R.F., Miller, G.C., Orr, G.L. (1982).** Oxidative pinking of white wines: recent observations. *Food Tecn. Australia*, 34, 44-47.
- Singleton, V.L., Rossi, I.A. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acids reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 144-158.
- Singleton, V.L., Esau P. (1969).** Phenolic substances in grape and wine and their significance. *Adv. Food Res.*, 1, 1-282.
- Singleton, V.L., Noble, A.C. (1976).** Wine flavor and phenolic substances. *ACS Symp. Ser.*, 26, 47-52.
- Singleton, V.L., Kramling, T.E. (1976).** Browning of white wines and an accelerated test for browning capacity. *Am. J. Enol. Vitic.*, 27, 157-160.
- Singleton, V.L. (1982).** Oxidation of wine. Proc. International Symposium on viticulture, vinification and the treatment and handling of wine. Ed. Oxford University.
- Singleton, V.L., Trousdale E. (1983).** White wine phenolics: varietal and processing differences as shown by HPLC. *Am. J. Enol. Vitic.*, 34, 27-34.
- Singleton, V.L., Zaya, J., Trousdale, E., Salgues, M. (1984).** Caftaric acid in grapes and conversion to a reaction product during processing. *Vitis*, 23, 113-120.

- Singleton, V.L., Zaya, J., Trusdale, E.K. (1986).** Caftaric and coutaric acids in fruit of *vitis*. *Phytochem.*, 25, 2127-2133.
- Singleton, V.L. (1987).** Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines and model systems: Observations and practical implications. *Am. J. Enol. Vitic.*, 38, 69-77.
- Singleton, V.L. (1995).** Maturation of wines and spirits: comparisons, facts and hypotheses. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 98-115.
- Soleas, G. J., Goldberg, D.M., Diamandis, E.P., Karumanchiri, A., Yan, J., Ng, E. (1995).** Influences of viticultural and oenological factors on changes in cis- and trans-veratrol in commercial wines. *J. Wine. Res.*, 6, 107-121.
- Somers, T.C. (1971).** The polymeric nature of wine pigments. *Phytochem.*, 10, 2175-2186.
- Somers, T.C., Vérette E., Pocock, K.F. (1987).** Hydroxycinnamate esters of *Vitis vinifera*: changes during White vinification, and effects of exogenous enzymic hydrolysis. *J. Sci. Food Agric.*, 40, 67-78.
- Somers, T.C., Vérette, E. (1988).** Phenolic composition of natural wine types. En: Modern methods of plant analysis. New series, vol. 6, Wine analysis. Ed. H.F. Linskens, J.F. Jackson. Springer-Verlag. Berlin.
- Spanos, G.A., Wrolstad, R.E. (1992).** Phenolics of apple, pear and white grape juices and their changes with processing and storage. A review. *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1478-1487.
- Statsoft, Inc. (1996).** STATISTICA for windows release 5.1, Tulsa, OK.
- Stead, D. (1993).** The effect of hydroxycinnamic acids on the growth of wine-spoilage lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol.*, 75, 135-141.

- Stephen, E., Mehmet, A., Mottram, D. (1997).** Comparison of dynamic headspace concentration on tenax with solid phase microextraction for the analysis of aroma volatiles. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2638-2641.
- Suomalinen, H., Lehtonen, M. (1979).** The production of roma compounds by yeast. *J. Inst. Brew.*, 85, 149-156.
- Swain, T., Hillis, W.E. (1959).** The phenolic constituents of *Prinus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. 117, 97-103.
- Thorngate, J.H. (1997).** The physiology of human sensory response to wine: A review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 48, 271-279.
- Tini, V., Zambonelli, C., Benevelli, M. (1995).** The autolysogenic *Saccharomyces cerevisiae* strains for the sparkling wines production. *Ind. Bevande*, 24, 113-118.
- Timberlake, C.F. Bridle, P. (1976).** Interactions between anthocyanins, phenolic compounds and acetaldehyde and their significance in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 27, 97-105.
- Usseglio-Tomasset, L., Bosia, P.D., Stefano, R. DI., Castino M. (1983).** The objective influence of yeast contact on the characteristics of sparkling wines prepared by the classic methods. *Vini Ital.*, 142, 3-9.
- Van der Merwe, C.A., Van Wyk, C.J. (1981).** The contribution of somne fermentation products to the odor of dry white wines. *Am. J.Enol. Vitic.*, 32, 41-46.
- Vanhoenacker, G., De Villiers, A., Lazou, K., De Keukeleire, S.P. (2001).** Comparasion of high-performance liquid chromatography-mass spectroscopy and capillary electrophoresis-mass spectroscopy for the analysis of phenolic compounds in diethyl ether extracts of red wines. *Chromatogr.*, 54, 309-315.

- Vas, G.Y., Koteleky, K., Farkas, M., Dobó, A., Vékey K. (1998a).** Fast Screening Method for Wine Headspace Compounds Using Solid-Phase Microextraction (SPME) and Capillary GC Technique. *Am. J. Enol. Vitic.*, 49, 100-104.
- Vas, G.Y., Gal, L., Harangi, J., Dobó, A., Vekey, K. (1998b)** Determination of volatile aroma compounds of Bläufränkisch wines extracted by Solid Phase Microextraction. *J. Chromatogr. Sci.*, 36, 505-510.
- Vidal, M., Blouin, J. (1978).** Dosage colorimétrique rapide de l'acide tartrique dans les mouts et les vins. *Rev. Fr. Oenol.*, 70, 39-46.
- Viegas, C.A., Rosa, M.F., Sa-Correia, I., Novais, J.M. (1989).** Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 21-28.
- Whiton, R.S., Zoecklein, B.W. (2000).** Optimization of headspace solid-phase microextraction for analysis of wine aroma compounds. *Am. J. Enol. Vitic.*, 51, 379-382.
- Wightman, J.D., Price, S.F., Watson, B.T., Wrolstad, R.E. (1997).** Some effects of processing enzymes on anthocyanins and phenolics in Pinot Noir and Cabernet Sauvignon wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 48, 39-48.
- Winter, M., Herrmann, K. (1986).** Esters and glucosides of hydroxycinnamic acids in vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 616-620.
- Wulf, L.W., Nagel, C.W. (1980).** Identification and changes of flavonoids in Merlot and Cabernet Sauvignon wines. *J. Food Sci.*, 45, 479-484.
- Yang, X., Peppard T. (1994).** Solid-Phase Microextraction for flavor analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1925-1930.
- Yoneyama, C., Kushida, T. (1980).** Composition of phenolic compounds in Koshu white wine. *J. Japan. Soc. Food Sci. Techn.*, 27, 623-626.

Zea, L., Moreno, J., Medina M., Ortega, M. J., (1994). Evolution of C₆, C₈ and C₁₀ acids and their ethyl esters in cells and musts during the ageing with three *Saccharomyces cerevisiae* races. *J. Ind. Microbiol.*, 13, 269-272.

Zoecklein, B.W., Marcy, J.E., Jasinski, Y. (1997). Effect of fermentation, storage sur lie or post-fermentation thermal processing on white riesling (*Vitis vinifera* L.) glycoconjugates. *Am. J. Enol. Vitic.*, 48, 397-402.

Reunido el tribunal que suscribe en el día
de la fecha, acordó calificar la presente Tesis
doctoral con SOPRESALENTE CUM LAUDE

MADRID 22 de MARZO de 2002